

**Versuche zur Standardisierung des Nachweises
von aufgeschlossenem Milcheiweiß in
Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Agglutination**

Marie-Luise Stutz-Baasch

=
1972
=

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs der
Tierärztlichen Fakultät der Universität
München.

Vorstand Prof. Dr. Dr. h. c. L. Kotter

Versuche zur Standardisierung des Nachweises
von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischer-
zeugnissen mit Hilfe der Agglutination.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München.

von

Marie-Luise Stutz-Baasch

aus

Homburg (Saarland)

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.



Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. L. Kotter

Korreferent: Priv. Doz. Dr. W. Gedek

Tag der Promotion: 11. Februar 1972.

In Dankbarkeit meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung	1
B Literatur	2
1. Präzipitation	2
a) Allgemeines	3
b) Röhrchenpräzipitation	4
c) Quantitative Präzipitattmessung	5
d) Agar - Gel - Diffusion	6
α Allgemeines	6
β Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	7
e) Immunelektrophorese	8
α Allgemeines	8
β Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	9
f) Fluoreszenzmethode	9
α Allgemeines	9
β Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	10
2. Agglutination	11
a) Allgemeines	11
b) Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	13
c) Latex - Test (L-T)	15
α Allgemeines	15
β Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	16
3. Konservierung der Erythrozyten	17
4. Immunisierungsmethoden zur Gewinnung von Antisera gegen aufgeschlossenes Milcheiweiß	20
a) Allgemeines	20
b) Angewandte Immunisierungsmethoden zur Gewinnung von Antisera gegen Fremdeiweiße	21

5. Extraktionsverfahren für den Nachweis von Fremdeiweiß	25
a) Allgemeines	25
b) Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß	26
C EIGENE UNTERSUCHUNGEN	28
I. Untersuchungen zur Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten mit Cialit, Baycovin und Merthiolat	28
II. Ersatz der Hammelerythrozyten durch Latexpartikel	55
1. Methodik des Latextestes	55
2. Bestimmung der geeigneten Lösungskonzentrationen von aufgeschlossenem Milcheiweiß zur Sensibilisierung der Latexpartikel	59
III. Ersatz der Latexpartikel durch Tuscheartikel	63
IV. Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels Latexpartikel in der Senkungsreaktion	66
1. Material und Methodik	66
a) Immunisierung	66
b) Rezeptur der Modellchargen und Extraktion	69
c) Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels der Senkungsreaktion	70
2. Vergleichende Prüfung verschiedener Extraktionsverfahren an Modellwürsten zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels der Latexmethode	73

3. Prüfung der in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	83
4. Bestimmung der Eiweißgehalte der Extraktionslösungen versch. Extraktionsverfahren mit Hilfe der Biuretreaktion	92
a) Methodik	92
b) Ergebnisse	93
5. Prüfung der mit verschiedenen Extraktionsverfahren erhaltenen Extrakte mittels der indirekten Hämagglutination mit formalinisierten sensibilisierten Erythrozyten	97
a) Durchführung der indirekten Hämagglutination	97
b) Ergebnisse	103
D DISKUSSION	116
E ZUSAMMENFASSUNG	124
F LITERATURVERZEICHNIS	126
G LEBENSLAUF	135

Versuche zur Standardisierung des Nachweises von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Agglutination.

A. E I N L E I T U N G

Die bisher bekannten chemischen Verfahren können den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß nur ungenügend führen. In letzter Zeit hat es nicht an Untersuchungen gefehlt, verschiedene serologische Methoden für den Nachweis von Fremdeiweiß in Fleischerzeugnissen vorzuschlagen.

Mit Hilfe der indirekten Hämagglutination (57) kann Milcheiweiß selbst in hocherhitzten Fleischerzeugnissen quantitativ nachgewiesen werden. Der große arbeits-technische Aufwand dieser Reaktion steht jedoch ihrer breiten Anwendung in der Routine entgegen.

Aus diesem Grunde soll in dieser Arbeit geprüft werden, inwieweit die indirekte Hämagglutinationsreaktion durch Standardisierung zu vereinfachen ist.

B. L I T E R A T U R

I. Serologischer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in erhitzten Fleischwaren:

Alle bisher bekannten serologischen Verfahren basieren auf einer Antigen-Antikörperreaktion, wobei sich grundsätzlich 3 Formen unterscheiden lassen:

Präzipitation	=	Fällung
Agglutination	=	Verklumpung
Lysis	=	Auflösung

Die Antigen-Antikörperreaktion ist eine spezifische Reaktion zwischen zwei kolloidalen Substanzen, die miteinander unter Bildung von Aggregaten, die makroskopisch als unlösliche Substanzen ausfallen, reagieren (35).

1. PRÄZIPITATION:

a) Allgemeines

Die Präzipitationsreaktion erlaubt Nachweis und quantitative Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern in Lösung und im Gewebe. Sie kann in flüssiger Phase, in Gel, sowie in Gewebeschnitten ausgeführt werden. Die Präzipitation tritt mit den meisten Antigenen ein, da diese multivalent und die Antikörper mindestens bivalent sind.

Erst nach dem HEIDELBERGER und seine Schule (25) exakte Methoden zur quantitativen Messung von Antigen und Antikörper eingeführt hatten, konnte der biochemische Ablauf der Präzipitation erklärt werden. Die Reaktion ist reversibel und kann unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden:



Bei Antigenüberschuß oder niedriger Antigen- Antikörper-Konzentration bilden sich lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe.



b) Röhrchenpräzipitation

UHLENHUT (63) wendete die Röhrchenpräzipitation erstmals zur Differenzierung verschiedener tierischer Proteine an. Diese biologische Untersuchung wurde 1908 auch für die Auslandsfleischschau bindend vorgeschrieben.

Die Röhrchenpräzipitation kann als α - Verfahren (Antikörper konstant, Antigenverdünnung) oder als β - Verfahren (Antigen konstant, Antikörperverdünnung) durchgeführt werden.

Antiserum und Antigen werden dabei entsprechend unter- oder überschichtet. Reagiert der Antikörper mit dem homologen Antigen, so zeigt die Ringbildung an der Berührungsstelle die positive Antigen-Antikörper-Reaktion an.

Der Vorteil dieser Reaktion besteht darin, daß sie ohne großen Arbeitsaufwand durchgeführt werden kann und das Ergebnis innerhalb von 15 min. abzulesen ist. Nachteilig wirkt sich bei dieser Reaktion die Voraussetzung aus, daß Antigen und Antikörper in klarer Lösung vorliegen müssen. Außerdem ist diese Reaktion wenig empfindlich und für den quantitativen Nachweis von Fremdeiweißen in hocherhitztem Material wenig geeignet.

Beim α - Verfahren wird methodisch mehr Serum benötigt als beim β - Verfahren. Trotzdem wurde den Lebensmitteluntersuchungsstellen für den Nachweis von Fremdeiweißen in Veröffentlichungen bisher nur das α -Verfahren empfohlen. SINELL(59), HELLMANN u. QUENTIN (26).

c) . Quantitative Präzipitattmessung

Bei der quantitativen Präzipitattmessung in flüssiger Phase sollte man die Funktion einer steigenden Menge Antigen zu einem bestimmten Antiserumvolumen betrachten. Die Genauigkeit der Methode hängt von der sorgfältigen Durchführung und der Menge der gemessenen Antigene oder Antikörper ab.

DEGENKOLB und HINGERLE (13) benutzten die quantitative Präzipitattmessung für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in auf 115° C erhitzten Fleischerzeugnissen. Sie legten die Reaktion in den Bereich des Antikörperüberschusses, um sicher zu sein, daß sich alles Antigen im Präzipitat befindet. Da erst die Untersuchung der Überstände die Aufstellung genauer Präzipitationskurven erlaubt, führten sie zur Bestimmung der Höhe des Fremdeiweißzusatzes neben gravimetrischen Präzipitattmessungen mit dem Überstand noch die indirekte Hämagglutination (I.H.) durch, um dabei noch gelöste Antikörper zu erfassen. Durch den Vergleich der Ergebnisse der Präzipitattmenge und der Serumtiter in der I.H. von fraglicher Probe mit Ergebnissen bei Kontrollwürsten, konnten die Verfasser Zusätze an aufgeschlossenem Milcheiweiß unter 1,0 mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ %, zwischen 1,0 und 2,0 % mit $\pm 0,15$ % und über 2,0 % mit $\pm 0,2$ % ermitteln.

Nach KABAT (35) können sich die Antigen- Antikörper-Verhältnisse jedoch von einem zum anderen Antiserum trotz gleicher Titerhöhe ändern. Selbst während der Reaktion ändert sich das Verhältnis Antikörper zu Antigen im Präzipitat laufend.

d) Agar - Gel - Diffusion

ℒ Allgemeines

Seit ihrer Einführung von OUDIN (52) sowie durch OUCHTERLONY (50, 51) wird die Präzipitationsreaktion in Gel auf allen Gebieten der Immunologie angewendet. Man unterscheidet zwischen der Einfach- und Doppeldiffusion.

Bei der Einfachdiffusion diffundiert entweder nur das Antigen oder nur der Antikörper, während bei der Doppeldiffusion Antigen und Antikörper in einem halbfesten Agar aufeinander zu diffundieren. In dem Agar wird eine Anzahl von Löchern gestanzt. Am häufigsten wird von den vielen Anordnungen die aus einem zentralen Loch mit 6 regelmäßigen darin angeordneten Außenlöchern verwendet.

Das zentrale Loch wird in der Regel mit Antiserum gefüllt, die Außenlöcher mit verschiedenen Antigenen oder einer Antigenverdünnungsreihe. Von jedem Loch aus findet eine konzentrische Diffusion statt, wobei sich beim Zusammentreffen der Antigens mit seinem spezifischen Antikörper "Präzipitationsbanden" bilden.

Die Agar-Gel-Diffusion zeichnet sich gegenüber der Röhrchenpräzipitation durch ihre größere Empfindlichkeit aus. Außerdem können getrübe Antigenlösungen und getrübe Antiseren verwendet werden. Der Antiserumbedarf ist geringer als bei der Röhrchenpräzipitation und der indirekten Hämagglutination.

β) Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß

Für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß verwendet HERRMANN (29) einen 1 %igen Reinagar der Behringwerke, der auf pH 7,2 eingestellt ist. Im Zentrum der Rosette wird das Antigen aufgetragen und das quadratisch verdünnte Antiserum rundherum im Abstand von 5 mm. 16 - 18 Std. nach dem Ansetzen der Reaktion werden Antigen und Antiserum einmal nachgetropft. Die Reaktion muß 24 Std. nach dem Ansetzen abgelesen werden. Später auftretende Präzipitatbanden müssen als unspezifisch angesehen werden. Mittels dieser Methode konnte HERRMANN (29) in Brühwürsten zwischen den Milcheiweißkonzentrationen von 1,5; 2,0; 2,5 und 3,0 % differenzieren. War das Untersuchungsmaterial 30 min. auf 80/85° C erhitzt worden, so konnten sie nur zwischen den Milcheiweißkonzentrationen von 1,0; 2,0 und 3,0 % differenzieren, bei Erhitzung auf 90/95° C ließen sich erst Konzentrationen ab 3,0 % erfassen.

WYLER und SIEGRIST (70) wiesen mit dieser Methode aufgeschlossenes Milcheiweiß in Konzentrationen ab 0,1 % nach. Über den Erhitzungsgrad der Erzeugnisse machten sie jedoch keine Angaben.

GÜNTHER (20) verwendete zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß die einfache Geldiffusion nach HAYWARD und AUGUSTIN (23) und die doppelte Geldiffusion nach OUCHTERLONY (50, 51). Die quantitative Auswertung erfolgte in Anlehnung an DARCY (11). Nach DARCY besteht eine direkte Beziehung zwischen dem Abstand des Präzipitates von der Antigenauftragungsstelle und dem

Logarithmus der Antigenkonzentration.

Ein lineares Verhältnis zwischen den Verdünnungen reiner Milcheiweißlösungen und den gemessenen Präzipitat-Abständen konnte auch GÜNTHER feststellen.

e) Immunelektrophorese

α Allgemeines

Die Immunelektrophorese, um deren Entwicklung sich GRABAR und WILLIAMS (19) verdient gemacht haben, ist eine Kombination von Elektrophorese und Agar-Gel-Diffusion. In einem Agar-Gel wird das Proteingemisch zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bewegung eines Proteins im elektrischen Feld wird in Gel durch sein elektrisches Potential und seinen elektroosmotischen Abtrieb bestimmt. Da beide entgegengesetzt wirken, erfolgt die Wanderung der Proteine je nach Größe der miteinander konkurrierenden Kräfte, entweder anodenwärts oder aufgrund des Abtriebes kathodenwärts. Die verschiedenen Proteine befinden sich dann nach abgeschlossener Auftrennung an verschiedenen Stellen in Agar. In die horizontal zur Auftragsstelle ausgestanzte Rinne wird Antiserum eingefüllt, sodaß bei der nun stattfindenden Doppeldiffusion die Proteine mit ihren Antikörpern unter Bildung von "Präzipitationsbogen" reagieren.

β Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß

HANSEN (21) sowie WADSWORTH und HANSEN (66) konnten mittels der von ihnen beschriebenen "Komparativ-Immunelektrophorese" einen Trockenmilchzusatz bis zu 0,1 % zum Untersuchungsmaterial noch sichtbar machen. KLUGE - WILM (37) sowie SINELL und KLUGE - WILM (59) wiesen mit Hilfe der Immunelektrophorese in der Mikroausführung nach SCHEIDEGGER (55) aufgeschlossen-
es Milcheiweiß in bis auf 120° C erhitzten Fleisch-
erzeugnissen in Konzentrationen ab 0,25 % nach. GÜNTHER (20) führte mit der Immunelektrophorese den qualitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß.

f) Fluoreszenz - Methode

α , Allgemeines

Die Antigen-Antikörperreaktion wird durch die klassischen serologischen Nachweismethoden nur indirekt nachgewiesen. Um die Antigen-Antikörperreaktion unmittelbar optisch nachweisen zu können, markierten COONS und KAPLAN (7) Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen.

Die Eiweißmoleküle einer gereinigten Antikörperlösung werden in vitro mit je 1 oder 2 Molekülen eines

fluoreszierenden Farbstoffes markiert, ohne daß dadurch die immunologische Spezifität beeinflusst wird. Wirken nun die markierten Antikörper auf die entsprechenden Antigene ein, so kommt es zur Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes. Die nicht gebundenen Antikörper werden ausgewaschen. Die gebildeten Antigen-Antikörperkomplexe lassen sich fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.

β Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß

HERRMANN, HOLFERT, u. PFEIFFER (28) haben aufgeschlossenes Milcheiweiß mit Hilfe fluoreszierender Antikörper in Fleischwaren nachgewiesen. Auch in Präparaten von bis auf 120° C erhitzten Fleischwaren konnten sie noch den positiven Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß führen. Allerdings waren die Fluoreszenzerscheinungen anteilmäßig geringer als in niedriger erhitzten Fleischwaren. Die Fluoreszenzmarkierungsmethode erlaubt jedoch nur einen qualitativen Nachweis.

2. AGGLUTINATION

a) Allgemeines

Anders als bei der Präzipitation wird die Antigen-Antikörperreaktion bei der Agglutination durch Verklumpung sichtbar gemacht.

KRAUS und LUDWIG (41) beschrieben erstmals die "direkte Hämagglutination". Sie wiesen nach, daß Erythrozyten durch die direkte Einwirkung eines mikrobiellen Antigens (Staphylokokken und Vibrionen) verklumpen.

Die ersten Versuche auf dem Gebiete der indirekten Hämagglutination wurden von KEOGH, NORTH und Warburton (36) gemacht.

Sie beobachteten, daß Antigene von *Hämophilus influenza* von roten Blutkörperchen adsorbiert werden können. Fügt man dann ein spezifisches Antiserum dazu, kommt es zur Agglutination.

Stoffe mit hämagglutinierenden Eigenschaften werden als Hämagglutinine bezeichnet. NETER (46) bezeichnet Stoffe, die sich an die Erythrozytenoberfläche heften, und dadurch erst die indirekte Hämagglutination ermöglichen, als "erythrozytenmodifizierende" Antigene; CHENG (6) nennt sie "erythrozytensensibilisierende Substanzen".

BOYDEN und GRABAR (4) vermuten an der Oberfläche der Erythrozyten Antigen spezifische Rezeptoren.

BOYDEN (3) ermöglichte die Fixation der Antigene an die Erythrozytenoberfläche durch Behandlung derselben mit Gerbsäure.

Die Vorgänge, welche die Antigene an die Erythrozyten fixieren, und jene bei Kontakt mit spezifischen Antiseren verklumpen lassen, sind noch nicht genau bekannt. Man vermutet vor allem, daß sich an der Oberfläche der Erythrozyten spezifische Rezeptoren befinden, mit denen die Antigene Kontakt aufnehmen können.

Nach BOYDEN und GRABAR (4) handelt es sich bei diesen Rezeptoren um Lipide.

LANDY (44) stellte fest, daß die Rezeptoren der Erythrozyten nur begrenzt von Antigenen abgesättigt werden können. Er bestimmte sowohl die geringste Antigenmenge, die noch positive Reaktion bewirkt, als auch die Menge Antigen, die für eine optimale Reaktion notwendig ist.

FULTHORPE (18) bemerkte eine Abschwächung der Reaktion bei Einwirkung steigender Polysaccharidverdünnungen. Nach NETER (48) können die Antigene nur in Gegenwart von Elektrolyten fixiert werden.

Nach SCHMIDT (57) fungieren die Erythrozyten bei der zweiten Phase der indirekten Hämagglutination, der Agglutination, als "Indikator" und machen die Antigen-Antikörperreaktion sichtbar.

Dank ihrer Eigenschaft, Antigen-Antikörperreaktionen über die Agglutination der Erythrozyten sichtbar zu machen, ist die indirekte Hämagglutination in der Mikrobiologie, sowie der klinischen Human- und Veterinärmedizin unentbehrlich geworden. Die indirekte Hämagglutination ist stabiler und empfindlicher als

die bakterielle Agglutination (57).

Auch NETER (47), LE MINOR (45), SIEBURTH (58) und andere bestätigen, daß die indirekte Hämagglutination höhere Titer ergab, als andere serologische Nachweismethoden.

Nach STAVITZKY (61,62) soll die Empfindlichkeit dieser Methode die Präzipitation um das 10-fache übertreffen.

b) Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß:

KOTTER, HERRMANN und CORSICO (39) beschrieben den quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in nativen, auf 70° C bzw. 115° C erhitzten Fleischwaren. Sie konnten aufgeschlossenes Milcheiweiß auch in bis auf 115° C erhitztem Material in Konzentrationen ab 0,1 % quantitativ erfassen. Für die quantitative Auswertung der Reaktion wurden Eichkurven für Rohwurst, Brühwurst und hocherhitzte Fleischerzeugnisse angefertigt. Als Toleranz wurden bei der Auswertung jeweils $\pm 0,1$ % aufgeschlossenes Milcheiweiß angegeben. Für die quantitative Auswertung muß nach Aussage der Verfasser mindestens ein Serumtiter von 16 000 vorhanden sein.

KLUGE - WILM (37), die in hocherhitzten Fleischwaren aufgeschlossenes Milcheiweiß nachwies, stellte vergleichende Untersuchungen zwischen der indirekten

Hämagglutination und der Immunelektrophorese an. Sie konnte die Untersuchungsergebnisse von KOTTER, HERRMANN u. CORSICO (39) nicht bestätigen und nur zwischen 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 und 2 %-igen Lösungen von aufgeschlossenem Milcheiweiß unterscheiden.

DEGENKOLB und HINGERLE (13) halten die indirekte Hämagglutination für Routineuntersuchungen für zu un- ständlich. Nur in strittigen Einzelfällen greifen die Autoren auf die indirekte Hämagglutination zum Nachweis von Fremdeiweiß, aufgeschlossenem Milcheiweiß, Trockenblutplasma und Sojaprotein zurück. Hoher Serumbedarf, umfangreicher Arbeitsaufwand und das Fehlen objektiver Beurteilungskriterien bei schwachen Hämagglutinationen erscheinen KLUGE-WILM (37) bei der indirekten Hämagglutination namentlich bei sehr umfangreichen Untersuchungen als fühlbarer Mangel. Sie konnte unabhängig vom Milcheiweißzusatz Titerabschwächungen feststellen. Nach ihrer Meinung ist die indirekte Hämagglutination sehr von Fremdeinflüssen, besonders in Fleischerzeugnissen abhängig. KOTTER, HERRMANN u. CORSICO (39) empfehlen die indirekte Hämagglutination vor allem für den quantitativen Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischwaren. Nach ihren Erfahrungen handelt es sich bei der indirekten Hämagglutination um eine besonders empfindliche und spezifische serologische Nachweismethode.

c) Latex - Test: (L.T.)

α) Allgemeines

"Latex besteht aus im Wasser aufgenommenen Vinylmonomeren, die durch geeignete freie radikalbildende Katalysatoren polymerisiert werden. Es werden kleine sphärische Polymeren, die den eigentlichen Latexpartikeln entsprechen, als kolloidale Suspension hergestellt, die im Wasser mittels chemischer Emulgatoren stabilisiert werden. Die monodispersen Latexpartikel mit uniformem Durchmesser von 0,1 bis 1,2 micron werden von der chemischen Gesellschaft Dow hergestellt." (65)

Der L.T. wurde erstmals 1956 von SINGER und PLOTZ (60) zur Diagnose chronisch-rheumatischer Zustände verwendet. Die Latexpartikel haben eine konstante Teilchengröße und sind im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4-6° C sehr lange haltbar.

Das Prinzip dieses Testes besteht darin, daß Kunststoffpartikel bekannter Größe und Menge mit löslichem Antigen beladen werden. Dieser Vorgang ist mit der Sensibilisierung der Erythrozyten bei der indirekten Hämagglutination vergleichbar. Die sensibilisierten Latexpartikel werden auf Objektträgern oder in Röhrchen mit dem Antikörper enthaltenden Serum oder dessen

Verdünnungen zusammengebracht. Es kommt zu einer Antigen-Antikörperreaktion in Form einer Agglutination. Der Antigen-Antikörperkomplex wird durch den Einbau der chemisch indifferenten, jedoch mit starker Adsorptionskraft ausgestatteter Kunststoffpartikel so vergrößert, daß die Reaktion mit bloßem Auge als Verklumpung sichtbar wird. (60)

Nach HEESCHEN (24) besitzt der LT. zwei grundsätzliche Fehlerquellen: bei einem zu hohen Antigengehalt der den Kunststoffpartikeln zugesetzten Lösung kann ein Teil des Antigens nicht adsorbiert werden. Die Antigen-Antikörperreaktion verläuft dann zwischen den Antikörpern des Serums und den freien, nicht adsorbierten Antigenen. Eine negative Agglutination wird vorgetäuscht. Bei nicht ausreichender Antigenmenge zur Sensibilisierung wird ebenfalls eine negative Reaktion vorgetäuscht.

Als weitere Nachteile der Latexpartikelsuspension muß ihre Neigung zu Spontanagglutinationen ihre gewisse Labilität, sowie ihre von Reaktionsmedien beeinflussbare Kohäsion genannt werden.

β Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß

FROMM (17) machte Versuche zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren, die 17 bis 30 min. bei Überdruck 117° C oder 121° C erhitzt worden waren, mit Hilfe der Latexmethode.

Er konnte Milcheiweißbeimischungen von 0,1 bis 0,3 % zwar gelegentlich, aber nicht absolut sicher mit dieser Methode nachweisen. Eindeutig nachweisbar war eine Milcheiweißbeimischung von 0,4 %. Noch deutlicher ließ sich eine Milcheiweißkonzentration von 0,5 bis 0,7 % bestimmen. Erst ab einer Konzentration von 1,0 % war jedoch der Milcheiweißnachweis mit Sicherheit zu führen.

3. KONSERVIERUNG DER ERYTHROZYTEN

Um die Methode der indirekten Hämagglutination wesentlich zu vereinfachen und eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, ist die Konservierung der sensibilisierten Erythrozyten das Mittel der Wahl. Bedingung für ein geeignetes Konservierungsverfahren ist jedoch die Verhinderung der Hämolyse der Erythrozyten. Bei längerer Aufbewahrung des Blutes zerfallen die Erythrozyten infolge der Entwicklung von Fäulnisbakterien und das Hämoglobin tritt aus der Stromahülle in das umgebende Milieu.

KOTTER und HERRMANN (40) untersuchten die Eignung von Cialit und Nipagin. Mit Cialit 1:10 000 versetzte sensibilisierte Erythrozyten konnten 10 Wochen aufbewahrt werden, ohne daß dadurch eine Beeinträchtigung der

Reaktion zu beobachten war. Nach 10 Wochen jedoch wurden die so behandelten Erythrozyten hämolytisch und die Reaktion verlor an Spezifität und Empfindlichkeit. Die mit Nipagin behandelten sensibilisierten Erythrozyten zeigten ähnliche Reaktionen, jedoch traten die Beeinträchtigungen der Reaktionen bereits nach 6 Wochen auf. Diese wesentlich früher auftretende Reaktionsbeeinträchtigung führen die Verfasser auf die schlechte Löslichkeit des Nipagins zurück, da es im Sensibilisierungsgemisch immer wieder zu Konzentrationsverschiebungen gekommen sei. Auch die Versuche, sensibilisierte Erythrozyten zu trocknen, ähnlich der Trockenblutdiagnose der Syphilis, zeigten keine befriedigende Ergebnisse.

In der Literatur ist verschiedentlich die Konservierung von Hammelerythrozyten mit Formalin beschrieben. FLICK, COX und FINGERHUT, INGRAHAM und CZISMAS (15,8, 31,32,9) versetzten die Erythrozyten mit 10 - 50 %igen Formalinlösungen. Diese hochprozentigen Lösungen verursachten jedoch beim ersten Kontakt mit der Erythrozytenaufschwemmung eine mehr oder weniger starke Hämolyse.

DANIEL (10) kombinierte die Methoden von INGRAHAM und CZISMAS (31,32,9). Er benutzte im Gegensatz zu INGRAHAM nur eine 3 %ige Formalinlösung. DANIEL (10) stellte nach 6 Wochen bei 4° C sowie bei -20° C aufbewahrten formalinisierten Erythrozyten keinen Titerabfall fest. Dagegen kam es bei den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Erythrozyten zu einem Aktivitätsverlust.

WIDE (68) konnte die formalinisierten Erythrozyten ohne Aktivitätsverlust für 2 - 3 Monate im Kühlschrank aufbewahren. Nach jedem Gebrauch erneuerte er den Puffer über dem Erythrozytensediment. Bei Lagerung der Erythrozyten bei Zimmertemperatur trat nach zwei Monaten ein Titerverlust um 75 % ein. INGRAHAM (31,32) berichtet über eine Haltbarkeit formalisierter Erythrozyten von über 15 Monaten ohne Verlust der serologischen Aktivität. Die Erythrozyten wurden in verdünntem Formalin bei 4° C aufbewahrt. WEINBACH (69) verwendete eine 3 %ige Formalinlösung. Er konnte keinen Reaktionsunterschied zwischen frischen und konservierten formalinsisierten Erythrozyten feststellen. Auch nach einer einjährigen Aufbewahrungsdauer war keine im Mikroskop sichtbare Veränderung festzustellen. HERRMANN und MERKLE (27) konservierten bereits mit Fremdeiweiß sensibilisierte Erythrozyten in Anlehnung an die Methode von WEINBACH. Bei der Prüfung der Haltbarkeit sowie des serologischen Reaktionsvermögens der formalinisierten sensibilisierten Erythrozyten stellten sie im Gegensatz zu WEINBACH fest, daß die serologische Aktivität eingeschränkt wird. Zwar hielten die formalinisierten, sensibilisierten Erythrozyten aufgrund der stabilisierenden Behandlung über 7 Monate relativ konstant ihren Endtiter, erreichten aber im Vergleich mit nativen sensibilisierten Erythrozyten nicht den gleich hohen Endtiter.

4. Immunisierungsmethoden zur Gewinnung von Antiseren gegen aufgeschlossenes Milcheiweiß

a) Allgemeines

Das Antigen muß zwei Eigenschaften besitzen: einmal die der Antikörperbildung und zum anderen die der Antikörperbindung. Je nach seiner Fähigkeit unterteilt SCHMIDT (57) das Antigen in Vollantigenen, Hapten, Halbhapten und determinante Gruppe. Ein Teil des Vollantigens ist dabei der Träger der antigenen Fähigkeit und ein Teil repräsentiert die determinante Gruppe, die nur Einfluß auf die Spezifität bei der Antikörperbindung- und bildung hat. Nicht jedes Eiweiß ist jedoch antigen (57). Ein Antigen läßt sich chemisch nicht definieren, sondern es gilt die allgemeine Aussage, daß zumindest bei "künstlichen" Antigenen ein Molekulargewicht von 2000 nicht überschritten werden darf (57).

Durch parenterale Einverleibung des Antigens bilden geeignete Tiere (Kaninchen, Pferd) Antikörper gegen dieses "Fremdeiweiß". Bei geringer Antigenmenge ist die Zunahme des Antikörpertiters proportional zur Antigenmenge. Bei steigender Antigenmenge erreicht jedoch der Titer eine Grenze, die auch bei Vermehrung von Antigenmenge und Behandlungsdauer nicht überschritten wird (57).

b) Angewandte Immunisierungsmethoden zur
Gewinnung von Antiseren gegen Fremdeiweiße

Erst in den letzten Jahren wurden die Fremdeiweiße immunologisch studiert. KRÜGER und GROSSKLAUS (42,43) geben einen Überblick von den bisher geübten Immunisierungsmethoden zur Gewinnung von Antiseren gegen Fremdeiweiße. Dabei werden die Immunisierungsmethoden von den einzelnen Autoren verschiedentlich modifiziert und unterscheiden sich in der Verabreichungsart von Hilfsstoffen, sowie in der vorangegangenen Antigenaufbereitung.

Das Antigen kann dabei intracutan, subcutan, intramuskulär, intravenös oder intraperitoneal injiziert werden. Werden größere Mengen von Antigen verabreicht, erfolgen die Injektionen intramuskulär oder subcutan.

Zwischen der Verabreichungsart und der Resorptionsgeschwindigkeit besteht ein direkter Zusammenhang. Bei der intracutanen, intramuskulären und intraperitonealen Injektion wird ein Antigendepot gebildet. Bei intravenöser Injektion wird das Antigen direkt vom Blut resorbiert und dabei die ihm zugehörigen Organe nahezu gleichzeitig mit der gesamten Menge des Antigens in Berührung gebracht. Bei der Technik der Antigen-deponierung wirkt in erster Linie das Antigen auf Teile des RES.

KOTTER und Mitarbeiter (38), sowie DEGENKOLB und HINGERLE (12) deponieren große Mengen von Antigen an verschiedenen Stellen des Körpers subcutan.

WARNECKE und SAFFLE (67) halten das intramuskuläre Depot mit kleineren Antigenmengen für besser geeignet. FROMM (17) immunisierte intravenös. SINELL und KLUGE-WILM (59) kombinieren die intracutane Depotsetzung mit der intravenösen Applikation.

Nicht nur die Aufteilung der Gesamtdosis in Einzeldosen, sondern auch die zeitliche Aufeinanderfolge der Injektionen sind für die Immunisierung von großer Bedeutung. KOTTER und Mitarbeiter (38) empfehlen bei der subcutanen Immunisierung mit 15 g Antigen in einer 1,5 %igen Aluminiumhydroxydsuspension pro Versuchstier einen zweitägigen Injektionsrhythmus. Durchschnittlich werden dabei 10 bis 15 Einzeldosen verabreicht. DEGENKOLB und HINGERLE (12) erzielten mit der gleichen Methode ebenfalls gute Ergebnisse. SINELL und KLUGE-WILM (59) teilten die Gesamtmenge Antigen in 4 Einzeldosen auf. Die kleinste Dosis verabreichten sie zu Beginn der Immunisierung zusammen mit Freundschens Adjuvans. Die übrige Antigenmenge verabreichen sie in drei Dosen, die sie an drei aufeinanderfolgenden Tagen injizieren. WARNECKE und SAFFLE (67) teilten die Gesamtdosis in 6 Einzeldosen auf, 4 Injektionen machten sie in 2-tägigem, zwei weitere in 10-tägigem Abstand. Die letzten beiden Injektionen erfolgten wieder in 2-tägigem Abstand. Ähnlich gute Ergebnisse hatten die Autoren auch mit der folgenden Methode: Sie verabreichten 2 Injektionen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Dann folgten 22 Ruhetage. Nach zwei weiteren Injektionen folgte nach 21 Tagen die Blutentnahme.

CATSIMPOOLAS, MEYER (5) sowie WARNECKE und SAFFLE (67) unterstützten die Antikörperbildung ebenfalls durch die gleichzeitige Applikation von Freundschens Adjuvans. Sie arbeiteten mit kleinen Antigenmengen.

Bei der Antigenaufbereitung für die Immunisierung ist darauf zu achten, daß vor allem Antiseren zum Nachweis von erhitztem bzw. autoklaviertem Eiweiß benötigt werden. Bei der Immunisierung mit nativen Material zeigen die nativen Antiseren zwar einen hohen gleichzeitig jedoch auch einen sehr hohen unspezifischen Titer. Die mit nativem Antigen gewonnenen Antiseren reagieren nur mit Extrakten aus Material, das nicht höher als bis auf 70° C erhitzt worden ist.

Um ein Antiserum zu gewinnen, das den Nachweis in auf über 70° C erhitzten Fleischerzeugnissen ermöglicht, ist es notwendig, das Antigen vor der Immunisierung entsprechend zu behandeln.

Nach HAUROWITZ (22) wirkt das Antigen bei der Synthese des Antikörpers im Sinne einer "Matrize". Das Antigen greift mittels seiner determinanten Gruppe in die Globulinbildung ein und führt auf diese Weise zur Bildung von Proteinen, die der determinanten Gruppe des Antigens räumlich angepaßt sind (template theory). Diese Theorie konnten PAULING und PRESSMAN (54) sowie HAUROWITZ (22) in ihren kinetischen Versuchen bestätigen.

SCHMIDT.(56) verwendete für seine Untersuchungen ein "Hitze-Alkali-Präzipitin", mit dem er sowohl natives als auch bis zu 100°C erhitztes Fleischeiweiß nachweisen konnte. HERRMANN (29) benutzte die Methode der Antigenaufbereitung zur Darstellung der Antigenlösungen für die Antiserumgewinnung gegen Fremdeiweiß in hocherhitzten Fleischerzeugnissen. Eine 10 %ige Fremdeiweißlösung wird 30 min. auf 70°C im Wasserbad erhitzt, anschließend mit 1 n NaOH versetzt und nochmals 15 min. auf 70°C erhitzt. Die Lösung wird nach dem Erkalten mit 1 n HCL neutralisiert. Mit Hilfe dieser Antigenaufbereitung gewinnt HERRMANN Antiseren, die sowohl mit nativem, als auch mit bis auf 115°C erhitztem Material reagieren.

DEGENKOLB und HINGERLE (12) erhitzen eine 10 %ige Antigenlösung 30 min. im Wasserbad auf 75°C . Für den Nachweis von Pflanzeneiweiß in hocherhitztem Material erhitzen sie das Antigen 30 min. auf 110°C .

5. Extraktionsverfahren für den Nachweis von Fremdeiweiß

a) Allgemeines

Serologische Reaktionen erfordern das Vorliegen einer ausreichenden Menge an gelösten Proteinen. Diese Voraussetzung zu erfüllen ist gerade bei hocherhitztem Material sehr problematisch (1).

Nur beim Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper im Gewebsschnitt ist die Extraktion des Antigens nicht notwendig.

Bereits 1912 betonte SCHMIDT (56), daß die Art des Extraktionsverfahrens über den Erfolg des serologischen Nachweises entscheidet. Zwei Faktoren erschweren den Nachweis von Eiweiß: die begrenzte serologische Aktivität infolge der Hitzedeanaturierung sowie die verminderte Löslichkeit des Eiweißes aufgrund der vorausgegangenen Erhitzung. Auch UHLENHUT (63) betonte die Schwierigkeit, "aus gekochtem Fleisch gut reagierbare Extrakte zu gewinnen". JENESS und PATTON (34) konnten beweisen, daß die native Konfiguration der Proteine dann zerstört ist, wenn sie über einen kritischen Punkt hinaus erhitzt worden sind.

Nach JAENICKE (33) besteht die Hitzedeanaturierung in einer Demarkierung reaktiver Gruppen. Aus der nativen, geordneten und gerollten Struktur entsteht eine entrollte, willkürliche Konfiguration, wobei gleichzeitig Molekülgruppen freigesetzt werden.

b) Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß

Die für den serologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß beschriebenen Extraktionsverfahren unterscheiden sich einmal durch die Verwendung verschiedener Extraktionsmittel und zum anderen durch unterschiedliche Extraktionsdauer, Extraktionstemperatur, Lösungsmittelmenge und pH-Wert des Lösungsmittels, sowie Zerkleinerungsgrad des Materials. FROMM (16,17) löste das Untersuchungsmaterial mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 und homogenisierte es im Ultraturrax. Ein Teil des Extraktes verblieb eine Woche im Kühlschrank, der andere Teil 90 min. bei 40° C im Wasserbad. Dabei erhielt er mittels der Extraktion im Kühlschrank bessere Ergebnisse als bei der Extraktion im Wasserbad. GÜNTHER (20) versetzte 10 g Wurstmateriel mit 14 ml Barbitalpuffer, mit Hilfe von Seesand wird das Material gleichmäßig im Mörser verrieben und mit 6 ml Puffer nachgespült. Das Gemisch wird 2 Std. bei 40° C im Brutschrank extrahiert, anschließend 10 min. bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand filtriert. KLUGE-WILM (37) benutzen zur Extraktion 5 g Untersuchungsmaterial, das mit 5 ml kochender physiologischer Kochsalzlösung gemischt worden ist. Das Gemisch wird 24 Std. bei Zimmertemperatur extrahiert und anschließend 30 min. bei 5000 Umdrehungen abzentrifugiert. KOTTER und HERRMANN (39) beschreiben zwei

Extraktionsverfahren für Fleischerzeugnisse, die bis auf 80° C erhitzt worden sind, werden 100 g Wurst-Material im Verhältnis 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt und 48 Std. im Kühlschrank oder 90 min. im Brutschrank bei 37° C extrahiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand im Test verwendet; für Fleischerzeugnisse, die über 80° C erhitzt worden sind, wird das Untersuchungsmaterial zerkleinert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird im Verhältnis 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt 48 Std. im Kühlschrank extrahiert.

DEGENKOLB u. HINGERLE (12,13) bestimmten zuerst den Wassergehalt des Untersuchungsgutes: Zu 15 g gewolften Materials gaben sie je nach Wassergehalt 20 - 40 ml physiol. Kochsalzlösung. Sie homogenisieren das Gemisch mit Hilfe eines Ultraturrax 30 sec. bei 24 000 Umdrehungen/min. Das Homogenisat stellen sie durch Zugabe einiger Tropfen Natronlauge auf pH 7,5 - 8,0 ein. Der wäßrige Extrakt wird durch scharfes Zentrifugieren von fettigen und festen Bestandteilen befreit. Anschließend wird der Extrakt dialysiert und lyophilisiert.

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Untersuchungen zur Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten mit Cialit, Baycovin und Merthiolat.

Die Haltbarkeit der mit aufgeschlossenem Milcheiweiß sensibilisierten Erythrozyten wurde untersucht, nachdem diese mit den Konservierungsmitteln Cialit⁺, Baycovin⁺⁺ oder Merthiolat⁺⁺⁺ versetzt worden waren.

Für die Sensibilisierung wurde frisch entnommenes Hammelblut mindestens 3 mal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen und über Nacht bei 4-6° C im Kühlschrank aufbewahrt. 5 ml gewaschene Hammelerythrozyten werden mit 17,5 ml physiol. Kochsalzlösung und unter vorsichtiger Zugabe mit 2,5 ml einer frisch angesetzten 0,1 %-igen Tanninlösung versetzt. Diese Erythrozytenaufschwemmung verblieb 15 min. bei Zimmertemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit physiol. Kochsalzlösung wurde das Erythrozytensediment mit physiol. Kochsalzlösung auf 25 ml aufgefüllt. Zur Sensibilisierung wurden 5 ml einer 0,5 %-igen Lösung von aufgeschlossnem Milcheiweiß mit 10 Vol % gewaschener nicht mit Tannin behandelter Hammelerythrozyten versetzt, nach 15 min. abzentrifugiert und der klare Überstand weiterverwendet. Zu 5 ml so behandelter Eiweißlösung wurden 5 ml tanninbehandelter Hammelerythrozyten zugegeben, 2 Std. bei 37° C im Brutschrank inkubiert und anschließend zentrifugiert.

+ Firma Asid ++ Firma Bayer +++ Firma Schuchardt.

Das Sediment wurde sooft (mindestens 3 mal) mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen, bis der Überstand klar war. Das letzte Sediment wurde mit physiol. Kochsalzlösung auf 20 ml aufgefüllt.

Die derart sensibilisierten Hammelerythrozyten wurden mit Cialit versetzt, in Ampullen zu 5 ml abgefüllt und im Kühlschrank bei 4-6° C gelagert.

Von den für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden Antiseren wurden der Antikörpergehalt mittels nativer sensibilisierter Hammelerythrozyten in der indirekten Hämagglutination bestimmt. Die Ergebnisse der Titerbestimmung der Antiseren gegen aufgeschlossenes Milcheiweiß sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Nach jeweils 5, 15, 21 und 42 Tagen wurden die mit Cialit konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten auf ihre Aktivität mit dem Antiserum S 1 geprüft. In einem Ansatz wurden die sensibilisierten Hammelerythrozyten direkt in der Cialitaufschwemmung (Ck) und zum anderen nach dem Abzentrifugieren des Cialithaltigen Überstandes und erneuter Aufschwemmung in physiol. Kochsalzlösung (Cz) untersucht. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tab. 2 und 3 zusammengestellt.

Tabelle 1

Titerbestimmung der zur Verfügung stehenden Antisera

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
S 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
S 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
S 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
S 6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
S 7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+
S 9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+
S 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
S 11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung:

S 1 - S 12 = Antiserum gegen aufgeschlossenes Milcheiweiß.

Tabelle 2

Aktivitätsprüfung der mit Cialit konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 5 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65356
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Ck 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
Cz 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+

Zeichenerklärung:

Ck = Cialit (konzentriert) 0,01%

Cz = Cialit (zentrifugiert) 0,01%

S₁ = Antiserum gegen Milcheiweiß

Tabelle 3

Aktivitätsprüfung der mit Cialit konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 15 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65356
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Ck 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
Cz 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 2!

Ergebnisse:

Nach 5 Tagen konnte bereits eine Aktivitätsschwächung um 2 Verdünnungsstufen beobachtet werden, während nach 15 Tagen ein Aktivitätsverlust um 5 bzw. 6 Verdünnungsstufen auftrat, wobei die Reaktion bereits leichte Hämolyse zeigte.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die mit aufgeschlossenen Milcheiweiß sensibilisierten Hammelerythrozyten in 1,2 Vol % Alseverscher Lösung aufgeschwemmt und mit verschiedenen Konzentrationen von Cialit konserviert. Die Aktivität so behandelter sensibilisierter Hammelerythrozyten wurde mit dem Antiserum (S 5) mit einem Titer von 2000 geprüft. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tab. 4, 5 und 6 zusammengestellt.

Tabelle 4

Aktivitätsbestimmung der mit unterschiedlichen Cialitkonzentrationen konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten 5 Tage nach dem Ansatz.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+
C 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+
C 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
C 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
C 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
C 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
C 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung:

S₅ = Antiserum gegen Milcheiweiß

C = Cialit (0,03-0,15 %)

Tabelle 5

Aktivitätsprüfung der mit unterschiedlichen Cialitkonzentrationen konservierten, sensibilisierten Hammeleerythrozyten 15 Tage nach dem Ansatz.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
C 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+
C 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
C 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
C 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
C 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 4!

Tabelle 6

Aktivitätsbestimmung der mit unterschiedlichen Cialitkonzentrationen konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten 21 Tage nach dem Ansatz.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
C 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
C 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
C 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
C 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
C 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 4!

Ergebnisse:

5 Tage nach der Konservierung zeigten die mit Cialit 0,03 sowie 0,12 % versetzten sensibilisierten Hammelerythrozyten einen Titerverlust um 2 Verdünnungsstufen. Nach 15 Tagen wiesen die mit Cialit 0,03 % versetzten, sensibilisierten Hammelerythrozyten gegenüber den mit Cialit 0,12 % versetzten einen weiteren Aktivitätsverlust um 1 Verdünnungsstufe auf. Nach 21 Tagen sank der Serumtiter bei den mit Cialit 0,03 % konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten um eine weitere Verdünnungsstufe, während die mit Cialit 0,12 % konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten ebenfalls um eine Verdünnungsstufe absanken.

Der Aktivitätsverlust der konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten war bereits nach 21 Tagen so hoch, daß auf weitere Prüfungen verzichtet wurde. Die Reaktion zeigte allerdings noch keine Hämolyse.

In einem weiteren Versuch wurden die sensibilisierten Hammelerythrozyten mit Baycovin versetzt, in Ampullen zu 5 ml abgefüllt und im Kühlschrank bei 4-6° C gelagert.

Nach jeweils 5, 15, 21 und 42 Tagen wurden die mit Baycovin konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten auf ihre Aktivität mit dem Antiserum S 1 und S 4 geprüft.

In einem Ansatz wurden die sensibilisierten Hammelerythrozyten direkt in der Baycovinaufschwemmung (Bk) und zum anderen nach dem Abzentrifugieren des baycovinhaltigen Überstandes und erneuter Aufschwemmung in physiol. Kochsalzlösung (Bz) untersucht.

Die Aktivität der konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten wurde mit dem Serum S 1 geprüft.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tab. 7 und 8 zusammengestellt.

Ergebnisse:

Nach 5 Tagen konnte bereits eine Aktivitätsschwächung um eine Verdünnungsstufe beobachtet werden, während nach 15 Tagen ein Aktivitätsverlust um 5 Verdünnungsstufen auftrat, wobei die Reaktion bereits leichte Hämolyse zeigte.

Tabelle 7

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 5 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Bk 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
Bz 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 8!

Tabelle 8

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 15 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Bk 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
Bz 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+

Zeichenerklärung: Bk = Baycovin konzentriert, 0,01 %
Bz = Baycovin zentrifugiert, 0,01 %
S₁ = Antiserum gegen Milcheiweiß

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die mit aufgeschlossenen Milcheiweiß sensibilisierten Hammelerythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Baycovin konzentriert. Die Aktivität so behandelte sensibilisierter Hammelerythrozyten wurde mit dem Antiserum S 4 mit einem Titer von 8000 geprüft. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tab. 9, 10, 11 und 12 zusammengestellt.

Ergebnisse:

5 Tage nach der Konservierung zeigten die mit Baycovin 0,03 und 0,05 % versetzten sensibilisierten Hammelerythrozyten einen Titerverlust um eine Verdünnungsstufe. Nach 15 Tagen wiesen die mit Baycovin 0,03 % versetzten sensibilisierten Hammelerythrozyten einen weiteren Aktivitätsverlust um 1 Verdünnungsstufe auf, während die mit Baycovin 0,05 % versetzten, sensibilisierten Hammelerythrozyten einen Titerverlust um 2 Verdünnungsstufen zeigten. Nach 21 Tagen sank der Serumtiter bei den mit Baycovin 0,03 % konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten um weitere zwei Verdünnungsstufen, während die mit Baycovin 0,05 % versetzten sensibilisierten Hammelerythrozyten nur um eine weitere Verdünnungsstufe absanken.

Da der Aktivitätsverlust der konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten bereits nach 42 Tagen so hoch war und die Reaktion schon leichte Hämolyse zeigte, wurde auf weitere Prüfungen verzichtet.

Tabelle 9

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 5 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
B 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
B 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
B 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+
B 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+
B 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+

Zeichenerklärung: S₄ = Antiserum gegen Milcheiweiß

B = Baycovin (0,03 - 0,15 %)

Tabelle 10

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 15 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+
B 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
B 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
B 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
B 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
B 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung bei Tabelle 9!

Tabelle 11

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 21 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
B 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
B 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
B 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
B 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
B 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 9!

Tabelle 12

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 42 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B O,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
B O,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
B O,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
B O,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
B O,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
B O,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 9!

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die mit aufgeschlossenen Milcheiweiß sensibilisierten Hammelerythrozyten in 1,2 Vol % Alseverscher Lösung aufgeschwemmt und mit verschiedenen Konzentrationen von Baycovin konserviert.

Die Aktivität so behandelter sensibilisierter Hammelerythrozyten wurde mit dem Antiserum S 4 mit einem Titer von 2000 geprüft. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tab. 13 bis 16 zusammengestellt.

Ergebnisse:

5 Tage nach der Konservierung zeigten die mit Baycovin 0,03 % versetzten sensibilisierten Hammelerythrozyten einen Titerverlust um 2 Verdünnungsstufen, während die mit Baycovin 0,05 % versetzten Hammelerythrozyten einen Aktivitätsverlust um 3 Verdünnungsstufen aufwiesen. Nach 15 Tagen sank der Antiserumtiter der mit Baycovin 0,03 % versetzten Hammelerythrozyten um eine weitere Stufe. Der Titer der mit Baycovin 0,05 % versetzten Hammelerythrozyten blieb gleich. Nach 21 Tagen war der Titer der mit Baycovin 0,03 % versetzten Hammelerythrozyten bereits um 5 Verdünnungsstufen gesunken, während der Titer der mit Baycovin 0,05 % versetzten Hammelerythrozyten nur um 4 Verdünnungsstufen gesunken war. Nach 6 Wochen war der Aktivitätsverlust der konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten bereits so hoch, daß auf weitere Prüfungen verzichtet wurde. Außerdem zeigte die Reaktion leichte Hämolyse.

Tabelle 13

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerthromozyten 5 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
B 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 9!

Tabelle 14

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerthromozyten 15 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
B 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 9!

Tabelle 15

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 21 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
B 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 9!

Tabelle 16

Aktivitätsprüfung der mit Baycovin konservierten, sensibilisierten
Hammelerythrozyten 42 Tage nach der Konservierung.-

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
B 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 9!

In weiteren Versuchen wurden die mit aufgeschlossenem Milcheiweiß sensibilisierten Hammelerythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Merthiolat versetzt, in Ampullen zu 5 ml abgefüllt und im Kühlschrank bei 4-6° C gelagert. Nach jeweils 5, 15, 21 und 42 Tagen wurden die so behandelten Erythrozyten auf ihre Aktivität mit dem Antiserum S 1 und S 2 geprüft. In einem Ansatz wurden die sensibilisierten Hammelerythrozyten direkt in der Merthiolataufschwemmung (Mk) und zum anderen nach dem Abzentrifugieren des Merthiolat-haltigen Überstandes und erneuter Aufschwemmung in physiol. Kochsalzlösung (Mz) untersucht. Die Aktivität der konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten wurde mit dem Serum S 1 geprüft. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen 17 und 18 zusammengestellt.

Ergebnisse:

Nach 5 Tagen konnte kein Aktivitätsverlust festgestellt werden, während nach 15 Tagen bei den sensibilisierten mit Merthiolat konservierten Hammelerythrozyten ein Titerverlust von 5 bzw. 6 Verdünnungsstufen auftrat. Die Reaktion zeigte auch eine leichte Hämolyse.

Tabelle 17

Aktivitätsprüfung der mit Merthiolat konservierten Hammelerythrozyten
5 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Mk 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Mz 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 18 !

Tabelle 18

Aktivitätsprüfung der mit Merthiolat konservierten Hammelerythrozyten
15 Tage nach der Konservierung

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Mk 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
Mz 0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung: Mk = Merthiolat konzentriert, 0,01 %
Mz = Merthiolat zentrifugiert 0,01 %
S₁ = Antiserum gegen Milcheiweiß

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die mit aufgeschlossenen Milcheiweiß sensibilisierten Hammelerythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Merthiolat konserviert. Die Aktivität so behandelter Hammelerythrozyten wurde mit dem Antiserum S 2 mit einem Titer von 8000 geprüft.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tab. 19 - 22 zusammengestellt.

Ergebnisse:

5 Tage nach der Konservierung zeigten die mit Merthiolat 0,03 %, 0,05 %, 0,11 %, 0,12 % und 0,15 % versetzten Hammelerythrozyten einen Aktivitätsverlust um eine Verdünnungsstufe, während die mit Merthiolat 0,07 % versetzten Hammelerythrozyten bereits einen Aktivitätsverlust um 2 Verdünnungsstufen zeigten. Nach 15 Tagen sank der Antiserumtiter der mit Merthiolat 0,05 % und 0,12 % versetzten Hammelerythrozyten um eine weitere Verdünnungsstufe, während der Titer der mit Merthiolat 0,07 % versetzten Hammelerythrozyten gleich blieb. Die mit Merthiolat 0,03, 0,11 und 0,15 % versetzten Hammelerythrozyten sanken jeweils um eine Verdünnungsstufe weiter ab. Nach 21 Tagen waren die mit Merthiolat 0,07% versetzten Hammelerythrozyten um insgesamt 2 Verdünnungsstufen gesunken. Die mit Merthiolat 0,03 und 0,05 % versetzten Hammelerythrozyten hatten nach 21 Tagen einen Aktivitätsverlust um 3 Verdünnungsstufen. Die mit Merthiolat 0,11 und 0,12 % versetzten Hammelerythrozyten zeigten einen Titerverlust um insgesamt 4 Verdünnungsstufen, die mit Merthiolat 0,15 % versetzten Hammelerythrozyten einen um 5 Verdünnungsstufen.

Tabelle 19

Aktivitätsprüfung der mit Merthiolat konservierten Hammelerythrozyten
5 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
M 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
M 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
M 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
M 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
M 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
M 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+

Zeichenerklärung: S₂ = Antiserum gegen Milcheiweiß
M = Merthiolat (0,03 - 0,15 %)

Tabelle 20

Aktivitätsprüfung der mit Merthiolat konservierten Hammelerythrozyten
15 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
M 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
M 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
M 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
M 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
M 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
M 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 19!

Tabelle 21

Aktivitätsprüfung der mit Merthiolat konservierten Hammelerythrozyten
21 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
M 0,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
M 0,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
M 0,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
M 0,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
M 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
M 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 19!

Tabelle 22

Aktivitätsprüfung der mit Merthiolat konservierten Hammelerythrozyten

42 Tage nach der Konservierung.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
S 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
M o,03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
M o,05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+
M o,07	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
M o,11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
M o,12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
M o,15	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 19 !

Nach 42 Tagen war der Aktivitätsverlust der mit Merthiolat versetzten sensibilisierten Hammel-erythrozyten so hoch, daß eine weitere Überprüfung der Aktivität unterlassen wurde.

II. Ersatz der Hammelerythrozyten durch Latexpartikel:

Da die Konservierungsversuche der sensibilisierten Hammelerythrozyten mit Cialit, Baycovin und Merthiolat ohne nennenswerten Erfolg verliefen, wurde in weiteren Untersuchungen geprüft, Hammelerythrozyten durch Latexpartikel zu ersetzen. Eine 0,1 %ige Lösung des aufgeschlossenen Milcheiweißes erwies sich als optimale Konzentration. Zur Sensibilisierung der Latexpartikel für die negative Kontrolle im L.T. mit aufgeschlossenem Milcheiweiß war eine 2,5 %ige Lösung am besten geeignet. Zur vollständigen Lösung des aufgeschlossenen Milcheiweißes in den verwendeten Lösungskonzentrationen kam es nach 12 stündigem Rühren (Magnetrührer) im Eisschrank.

1. Methodik des L.T.:

Herstellung der Eiweißlösungen von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Konzentrationen von 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 und 0,5 g in 100 ml 8 %iger Saccharoselösung für die Sensibilisierung:

Die Lösungen werden 1 Std. kräftig im Magnetrührer oder im Schüttelapparat gemischt, anschließend 1 Std. im Wasserbad bei 37°C gehalten und 12 Std. im Kühlschrank bei $4-6^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Anschließend werden die Lösungen 1 Std. bei 15 000 Umdrehungen abzentrifugiert, der klare Überstand dekantiert und bei -20°C eingefroren. Der Vorgang - Einfrieren, Auftauen, Zentrifugieren - wurde sooft wiederholt, bis die zuletzt dekantierte Flüssigkeit glasklar und partikelfrei war.

Mit dem Photodensimeter wird ein konstanter Eiweißgehalt der Extraktlösungen eingestellt. Blindwert ist eine 8 %ige Saccharoselösung.

Sensibilisierung der Latexpartikel:

4,0 ml des Saccharose- Eiweiß- Extraktes werden mit 1,0 ml der Kunststoffpartikelsuspension (11 %ig) 1 Std. bei 37°C unter häufigem Schütteln im Wasserbad sensibilisiert. Anschließend werden 10 ml 8 %ige Saccharoselösung und 0,75 ml einer 10 %igen NaCl zugefügt. (Endverdünnung 0,5 %).

Antiserumaufbereitung:

1,0 ml Antiserum wird 30 min. bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.

Adsorption des Antiserums mit dem fraglichen Extrakt:

1,0 ml des Antiserums wird mit 0,5 ml Extrakt 1 Std. bei 37° C im Brutschrank gehalten und anschließend abzentrifugiert.

Durchführung des L.T.:

Senkungsreaktion:

In Agglutinationsröhrchen werden 0,5 ml 8 %ige Saccharoselösung vorgelegt, 0,5 ml Antiserum bzw. 0,5 ml des mit Extrakt voradsorbierten Antiserums werden zu einer geometrischen Verdünnungsreihe ausverdünnt. Zu jedem Röhrchen werden 0,5 ml der sensibilisierten Latexpartikel zugefügt und anschließend aufgeschüttelt. Die Reaktion ist eine halbe bis zwei Std. nach dem Ansatz beendet. Infolge der Verklumpung der sensibilisierten Partikel in der Antiserumverdünnung kommt es zu einer Sedimentierung und Klärung der überstehenden Flüssigkeit. Je nach dem Grad der Sedimentierung in Abhängigkeit zur Zeit erfolgte die Beurteilung der Reaktion nach folgendem Schema:

10 Min.	- +	= Sedimentierung, leicht getrüberter Überstand
15 Min.	- +	= Sedimentierung, klarer Überstand
30 Min.	- ++	= vollständige Sedimentierung, klarer Überstand
	-	= keine Sedimentierung, völlige Trübung

b) Objektträgeragglutination:

0,2 ml des mit Extrakt voradsorbierten Serums werden mit 0,2 ml kochsalzfreier sensibilisierter Latexpartikel in einem Reagenzglas gut vermischt und anschließend auf einen Objektträger gleichmäßig verteilt.

Bei positiver Reaktion kommt es nach 10 Minuten zu einer körnigen Agglutination, bei negativer Reaktion bleiben die Lösungen homogen.

c) Röhrchenagglutination:

15 ml glasklare Saccharoseeiweißlösung werden mit 0,15 ml Latexsuspension gründlich vermischt und 1 Std. bei 37° C im Wasserbad gehalten.

0,5 ml Antiserum werden in 0,5 ml 8 %iger Saccharoselösung quadratisch ausverdünnt. Jedem Röhrchen werden 0,5 ml sensibilisierte Latexpartikel zugefügt und 1-2 min. unter Vermeidung von Schaumbildung sanft geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird 10 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend 3 min. bei 2000 - 2500 Umdrehungen/min. abzentrifugiert.

Bei vorsichtigem Aufschütteln des Zentrifugates sind bei positiver Reaktion die Agglutinate mit bloßem Auge zu erkennen.

Die Reaktion kann über Nacht stehen gelassen werden. Für die Beurteilung der Reaktion wird der Bodensatz vorsichtig aufgeschüttelt.

2. Bestimmung der geeigneten Lösungskonzentration von aufgeschlossenem Milcheiweiß zur Sensibilisierung der Latexpartikel.

Für die Sensibilisierung der Latexpartikel⁺ wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen von aufgeschlossenem Milcheiweiß auf ihre Eignung mittels der Objektträgeragglutination geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 23 zusammengestellt.

Ergebnis

Wie aus Tab. 23 zu ersehen ist, ist für die Sensibilisierung der Latexpartikel eine 0,1 %ige aufgeschlossene Milcheiweißlösung am geeignetsten. Die Lösungskonzentration wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Die Prüfung der Sensibilisierungskonzentration mit unterschiedlichem Antiserum gegen aufgeschlossenes Milcheiweiß mittels der Senkungsreaktion zeigten die in Tabelle 24, 25 und 26 zusammengefaßten Ergebnisse.

⁺ Partikelgröße: 0,61

Tabelle 23

Prüfung verschiedener Konzentrationen aufgeschlossener Milcheiweißlösungen auf ihre Eignung zur Sensibilisierung mittels der Objektträgeragglutination.

	2	4	8	16	32	64	128
pos 0,1	++	++	++	-	-	-	-
neg 2,5 %	++	-	-	-	-	-	-
pos 0,2	++	++	-	-	-	-	-
neg 2,5 %	++	+	-	-	-	-	-
pos 0,3	++	++	-	-	-	-	-
neg 2,5 %	++	++	-	-	-	-	-
pos 0,4	++	++	-	-	-	-	-
neg 2,5 %	++	+	-	-	-	-	-
pos 0,5	++	++	-	-	-	-	-
neg 2,5 %	++	+	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung:

- pos 0,1 S = positive Serumkontrolle mit ...%iger aufgeschlossener Milcheiweißlösung sensibilisierter Latexpartikel.
- neg 2,5 % = negative Serumkontrolle mit einem mit 2,5%iger aufgeschlossener Milcheiweißlösung voradsorbierten Antiserum.

Tabelle 24

Prüfung der 0,1 %igen Sensibilisierungskonzentration von aufgeschlossenen
Milchweiß mit einem Antiserumtiter von 65 000 mittels der

Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
neg 2,5 %	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 23!

Tabelle 25

Prüfung der 0,1 %igen Sensibilisierungskonzentration von aufgeschlossenen
Milchweiß mit einem Antiserumtiter von 65 000 mittels der

Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
neg 2,5 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 23!

Tabelle 26

Prüfung der 0,1 %igen Sensibilisierungskonzentration von aufgeschlossenen
Milcheiweiß mit einem Antiserumtiter von 32 000 mittels der

Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728
pos. 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
neg. 2,5%	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung bei Tabelle 23!

III. Ersatz der Latexpartikel durch Tuschepartikel.

Im weiteren wurde untersucht, inwieweit sich die Latexpartikel durch Tusche ersetzen lassen, da ERILL und GRAS (14) feststellten, daß Tusche weniger labil als Latex reagierte.

Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben von ERILL und GRAS (14). Zur Sensibilisierung der Tuschepartikel⁺ wurden verschiedene Lösungskonzentrationen von aufgeschlossenem Milcheiweiß geprüft. Dabei wurden gleiche Teile Antigen (aufgeschlossene Milcheiweißlösung) mit gleichen Teilen der Tuschesuspension versetzt. Die Tuschesuspension wird aus 1 Teil Tusche, gelöst in 1000 Teilen physiol. Kochsalzlösung hergestellt und 20 - 30 min. im Wasserbad bei 37° C gehalten.

Durchführung der Reaktion.

In Hämagglutinationsröhrchen werden je 0,5 ml physiol. Kochsalzlösung vorgelegt und 0,5 ml Antiserum quadratisch ausverdünnt. Zu jedem Röhrchen werden 0,5 ml der sensibilisierten Tuschepartikel zugegeben. Nach dem Aufschütteln verbleibt die Reaktion 90 min. im Brutschrank bei 37° C. Anschließend inkubiert der Reaktionsansatz über Nacht im Kühlschrank. Die Reaktion wird am folgenden Tag abgelesen. Bei positiver Reaktion sedimentieren die Tuschepartikel in den tiefsten Punkt der Reaktionsröhrchen.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 27 zusammengefaßt.

+ Pelikan-Tusche schwarz 2/5 Gl.oc.

Tabelle 27

Prüfung der verschiedenen Sensibilisierungskonzentrationen von aufgeschlossenem Milcheiweiß mit einem Antiserumtiter von 4 000 mittels der

Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
0,05 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
0,07 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
0,09 %	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,10 %	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,15 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
0,20 %	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25 %	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,30 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
0,35 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
0,40 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
0,45 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
0,50 %	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung: 0,05 % - 0,5 % = Sensibilisierungskonzentrationen von aufgeschlossenem Milcheiweiß.

Ergebnisse:

Wie aus Tabelle 27 ersichtlich wird, ist die Aktivität der Tuschepartikel wesentlich geringer, als die der Latexpartikel. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Anwendung dieser Methode zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß verzichtet.

IV. Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels Latexpartikel in der Senkungsreaktion.

1. Material und Methodik:

a) Immunisierung

Für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen mittels der Senkungsreaktion des Latextestes wurde für die Gewinnung des Antiserums eine 10 %ige Lösung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in physiol. Kochsalzlösung im Starmix gut verrührt, 30 min. bei 70° C im Wasserbad unter öfterem Umrühren erhitzt, anschließend mit 1 n Natronlauge versetzt und mit 1 n Salzsäure auf pH 7,0 - 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung nochmals 15 min. bei 70° C im Wasserbad erhitzt, nach Abkühlen erneut im Starmix homogenisiert und in einer 1,5 %igen Aluminiumhydroxydsuspension zur Immunisierung verwendet (56). Im Abstand von zwei Tagen wurden den Kaninchen je 10 ml der Antigenlösung subcutan injiziert. 5 Tage nach der letzten (15.) Injektion wurden die Tiere durch Herzpunktion entblutet. Das Blut wurde 1 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, vorsichtig mit dem Spatel von der Gefäßwand gelöst und anschließend 12 Std. im Kühlschrank bei 4 - 6° C aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde das überstehende Serum abzentrifugiert. Die Titerbestimmung der Antiseren erfolgte mittels der indirekten Hämagglutination. Die Ergebnisse der Titerbestimmungen sind in Tabelle 28 zusammengefaßt.

Tabelle 28

Titerbestimmung der gewonnenen Antiseren

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
S 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
S 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
S 6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++ bis 500 000	000
S 8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+

Zeichenerklärung: $S_1 - S_2$ = Antiseren gegen aufgeschlossenes Milcheiweiß

Die Seren S 1 - S 4 wurden vor ihrer Konservierung dialysiert.

Bei der Immunisierung nach KLUGE-WILM (37) wurde das Antigen 15 min auf 100° C erhitzt. Die hochkonzentrierte Antigenlösung wurde lyophilisiert und erfolgte nach dem von der Verfasserin angegebenen Schema.

1. Tag: 4 mg Antigen gelöst in 1,0 ml physiol. Kochsalzlösung wird zusammen mit 1,0 ml Freundschem Adjuvans complete als stabile Emulsion, verteilt auf 4 Körperstellen intra- und subcutan injiziert.

14.Tag: 10 mg Antigen gelöst in 3,0 ml physiol. Kochsalzlösung werden subcutan injiziert.

15. und 16. Tag: Je 10 mg Antigen, gelöst in 3,0 ml physiol. Kochsalzlösung werden i.v. injiziert.

Am 23. Tag wird der Probetiter bestimmt und bei ausreichender Titerhöhe wird das Tier am 24. Tag entblutet. Hat der Titer noch nicht einen ausreichenden Antikörpergehalt erreicht, so erfolgt am 25. Tag eine Auffrischung mit der stabilen Emulsion. Nach weiteren 14 Tagen (39. Tag) wird das Tier entblutet.

Das Antiserum wurde ebenfalls dialysiert und zur Konservierung in Ampullen zu 2 und 5 ml abgefüllt und lyophilisiert. Die Antiseren S 6 und S 8 wurden nach der von KLUGE-WILM (37) beschriebenen Immunisierungsmethode gewonnen.

b) Rezeptur der Modellchargen und Extraktion.

Die für die Untersuchungen benutzten Modellwürste wurden nach einer einheitlichen Grundrezeptur hergestellt:

40 % Rindfleisch
35 % Speck
Eis

2 % Nititpökelsalz pro kg Fleisch
und Speck
0,4 % Gewürz pro kg Brät
0,1 % Na-Ascorbat pro kg Brät

Diesem "Grundbrät" wurden aufgeschlossenes Milcheiweiß in Konzentrationen von 0,1 - 3 % zugesetzt. Ein Drittel des Materials blieb unerhitzt, ein Drittel wurde 30 min. auf 70° C Kerntemperatur, sowie 1/3 30 min. auf 115° C (Kerntemperatur) erhitzt. Das Material wurde für die Untersuchungen lyophilisiert.

Für die Extraktion der Modellchargen wurde jeweils 1 g Lyophilisat mit der 5-fachen Menge Veronalpuffer (ph 8,4) versetzt und für 2 Std. im Brutschrank inkubiert und anschließend 30 min. bei 5000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde im Test als Antigen weiter benutzt.

c) Für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mit Hilfe der Senkungsreaktion im Latextest wurden folgende Modellchargen geprüft:

Milcheiweißkonzentration:

Native Modellcharge: 1,0; 0,5; 0,2;

70⁰ C erhitzte Modellcharge: 2,0; 1,5; 1,0; 0,5;

115⁰ C erhitzte Modellcharge: 2,0; 1,5; 1,0; 0,5;

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengestellt.

Tabelle 29

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß im latex-Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
neg 2,5	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
Ko Nat	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Zeichenerklärung zu Tabelle 29.

pos 0,1	=	positiver Serumtiter
neg 2,5	=	negativer Serumtiter
Ko nat	=	nicht erhitzte Modellcharge ohne Zusatz an aufgeschlossenem Milcheiweiß
Ko 70°	=	auf 70° erhitzte Modellcharge ohne Zusatz an aufgeschlossenem Milcheiweiß
Ko 115°	=	auf 115° erhitzte Modellcharge ohne Zusatz an aufgeschlossenem Milcheiweiß
Nat. ...%	=	nicht erhitzte Modellcharge mit ...% aufgeschlossenem ME-Zusatz
70°..%	=	auf 70° erhitzte Modellcharge mit ..% aufg. ME-Zusatz
115°..%	=	auf 115° erhitzte Modellcharge mit ..% aufg. ME-Zusatz

Besprechung der Ergebnisse:

Wie aus Tabelle 29 ersichtlich wird, kann der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen selbst qualitativ nicht geführt werden. Die sicher frei von einem Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß geprüften Modellchargen riefen eine stärkere Hemmung des positiven Seruntiters hervor, als die mit einem Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß. Selbst innerhalb der geprüften unterschiedlichen Konzentrationen des Milcheiweißzusatzes kam es zu geradezu paradoxen Reaktionen, wobei besonders bei den auf 70° C erhitzten Modellchargen, diejenigen Reaktionen eine starke Titerhemmung hervorriefen, die den geringsten Zusatz an aufgeschlossenem Milcheiweiß besaßen. Bei allen geprüften Modellwürsten ist zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen an aufgeschlossenem Milcheiweiß nicht eindeutig zu differenzieren.

Deshalb wurde versucht, durch Verwendung anderer Extraktionsmethoden die Untersuchungsergebnisse zu verbessern.

2. Vergleichende Prüfung verschiedener Extraktionsmethoden an Modellwürsten zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels der Latexmethode:

Unter Beibehaltung des oben beschriebenen Extraktionsverfahrens wurden die Extraktionslösungen und die Extraktionsdauer verändert. Die in Tabelle 30 zusammengestellten Untersuchungsergebnisse wurden mit einem

Tabelle 30

Nachweis von aufgeschlossener Milcheiweiß im latex-
Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
neg 2,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Extrakt erhalten, bei dem das Antigen 24 Std. mit Veronalpuffer (ph 8,4) zur Extraktion angesetzt worden war.

Tabelle 31 faßt die Untersuchungsergebnisse zusammen, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen 48 Std. mit Veronalpuffer (ph 8,4) zur Extraktion angesetzt worden war.

In Tabelle 32 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen 2 Std. mit kochendem Veronalpuffer (ph 8,4) im Brutschrank bei 37° C angesetzt worden war.

Tabelle 33 faßt die Untersuchungsergebnisse zusammen, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen 24 Std. mit kochendem Veronalpuffer (ph 8,4) zur Extraktion angesetzt worden war.

Die in Tabelle 34 zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse wurden mit einem Extrakt erhalten, bei dem das Antigen mit kochendem Veronalpuffer 48 Std. zur Extraktion angesetzt worden war.

Tabelle 35 zeigt die Untersuchungsergebnisse, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen 2 Std. mit Phosphatpuffer (ph 4,8) im Brutschrank bei 37°C angesetzt worden war.

In Tabelle 36 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen 24 Std. mit Phosphatpuffer (ph 4,8) zur Extraktion angesetzt worden war.

Tabelle 37 zeigt die Untersuchungsergebnisse, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen mit Phosphatpuffer (4,8 ph) 48 Std. im Kühlschrank bei 4° C extrahiert worden war.

Tabelle 31

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels
der Senkungsreaktion im latex-Test.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg 2,5	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Tabelle 32

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß im latex-Test
mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
neg 2,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Tabelle 33

Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß im latex-Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
neg 2,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Tabelle 34

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß im Latex-
Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
neg 2,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Tabelle 35

Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß im latex-
Test mittels der Senkungreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
neg 2,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung S.72!

Tabelle 36

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß im latex-
Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
neg 2,5	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Tabelle 37

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß im latex-
Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
neg 2,5	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung S. 72!

Besprechung der Ergebnisse:

Auch nach Änderung der Extraktionsdauer, sowie der Extraktionslösung konnte der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß nicht eindeutig geführt werden. Bei der Extraktion mit Phosphatpuffer und einer Extraktionsdauer von 48 Std. kann bei den auf 70° C erhitzten Modellchargen grob zwischen den Konzentrationen 0,5 - 2 % differenziert werden. Bei der Extraktion mit Veronalpuffer und einer Extraktionsdauer von 48 Std. im Kühlschrank ist eine Probedifferenzierung zwischen den einzelnen Konzentrationen bei den nativen, auf 70° C erhitzten, sowie bei den auf 115° C erhitzten Modellchargen möglich. Auch bei den mit kochendem Veronalpuffer 2 Std. im Brutschrank extrahiert, ist besonders bei den 70° C erhitzten Modellchargen eindeutig zwischen den Konzentrationen 0,5; 1,0; 1,5 und 2 % zu differenzieren. Bei allen angesetzten Untersuchungen führten die Kontrollchargen oft zu einer stärkeren Hemmung der Reaktion als die Milcheiweiß-haltigen Modellchargen.

3. Prüfung der in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß:

Im weiteren wurden deshalb noch die in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden überprüft. Die Modellchargen A, B, C wurden mittels der Extraktion nach KOTTER und HERRMANN (39), der Extraktion nach SINELL und KLUGE-WILM (59), der Extraktion nach FROMM (16,17) sowie der Extraktion nach GÜNTHER (20) geprüft.

In den Tabellen 38 - 43 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 38 zeigt die Untersuchungsergebnisse, die mittels der Senkungsreaktion im Latextest mit dem nach Angaben von FROMM (16,17) erhaltenen Extrakt gewonnen worden sind. Das Untersuchungsmaterial wurde dabei 1:5 mit physiol. Kochsalzlösung versetzt und im Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde das Antigen 90 min. bei 40° C im Wasserbad extrahiert. Tabelle 39 zeigt die Untersuchungsergebnisse, wenn der Extrakt mit physiol. Kochsalzlösung 1:5 versetzt, eine Woche bei 4° C im Kühlschrank gehalten worden war (16,17).

In Tabelle 40 sind die Untersuchungsergebnisse des Extraktionsverfahrens nach KOTTER und HERRMANN (39) zusammengestellt. Der Extrakt wurde 1:2 mit physiol. Kochsalzlösung versetzt, homogenisiert und 90 min. bei 37° C im Brutschrank extrahiert.

Die in Tabelle 41 zusammengestellten Ergebnisse wurden mit dem Extrakt gewonnen, der 48 Std. bei 4° C im Kühlschrank inkubiert worden war (39).

In Tabelle 42 sind die Untersuchungsergebnisse der Extraktion nach SINELL und KLUGE-WILM (59) zusammengestellt. Das lyophilisierte Untersuchungsmaterial wurde 1:2 mit kochender physiol. Kochsalzlösung versetzt, homogenisiert und 24 Std. bei Zimmertemperatur extrahiert.

Die in Tabelle 43 zusammengestellten Untersuchungsergebnisse wurden mit dem Extraktionsverfahren nach GÜNTHER (20) erhalten. Das lyophilisierte Untersuchungsmaterial wurde 1:3 mit Barbitalpuffer (ph 8,2) versetzt, im Mörtser verrieben und 2 Std. bei 40° C im Brutschrank extrahiert.

Tabelle 38

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß im latex-
Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
neg 2,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Tabelle 39

Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß im latex-Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
neg 2,5	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Tabelle 40

Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweißen im Latex-Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
neg 2,5	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72 !

Tabelle 41

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß im latex -
Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
neg 2,5	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-

Siehe Zeichenerklärung s. 72!

Tabelle 42

Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß
im Latex-Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
neg 2,5	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Ko 70°	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
Ko 115°	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-

Siehe Zeichenerklärung S. 72!

Tabelle 43

Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß im latex-
Test mittels der Senkungsreaktion.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
neg 2,5	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-
Ko nat	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
Nat 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
Nat 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
Nat 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Ko 70°	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
70° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
70° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
70° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Ko 115°	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
115° 2,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
115° 1,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
115° 1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
115° 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-

Siehe Zeichenerklärung Seite 72!

Besprechung der Ergebnisse:

Die geprüften Extraktionsverfahren führten nicht zu einer Verbesserung des Nachweises von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels des Latextestes. Von allen geprüften Extraktionsverfahren zeichnete sich das von FROMM (16,17) beschriebene Verfahren gegenüber allen anderen beschriebenen Extraktionsverfahren dadurch aus, daß hier die Kontrollchargen den gleichen Hemmtiter hervorriefen, wie die Milcheiweiß-haltigen Chargen. (Tabelle 39). Alle anderen Extraktionsverfahren zeigten die starke Titerabschwächung der Kontrolleextrakte, wie sie bereits mit anderen Extrakten erhalten worden waren.

Bei der Verwendung des Extraktionsverfahrens nach KOTTER und HERRMANN (39) bei 48-stündiger Extraktion im Kühlschrank war grob zwischen den unterschiedlichen Milcheiweiß-haltigen Zusätzen in allen geprüften Modellchargen zu differenzieren (Tabelle 41).

Bei der Extraktion nach SINELL und KLUGE-WILM (59) war nur bei den nativen und den auf 70° C erhitzten Chargen grob zwischen den verschiedenen Milcheiweiß-zusätzen zu differenzieren (Tabelle 42).

Bei der Extraktion nach GÜNTHER (20) konnte zwischen den Milcheiweißkonzentrationen 0,2 und 1 % in nativen und 0,5 und 2 % in 70° C und 115° C erhitztem Material differenziert werden (Tabelle 43).

4. Bestimmung der Eiweißgehalte der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der Biuretreaktion:

Da mit keinem der geprüften Extraktionsverfahren aufgeschlossenes Milcheiweiß im Untersuchungsmaterial mit Hilfe der Senkungsreaktion im L.T. eindeutig nachzuweisen war, wurde mittels der Biuret-Reaktion der Eiweißgehalt der mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren gewonnenen Extraktionslösungen der zur Untersuchung kommenden Modellchargen bestimmt. Die Biuretreaktion wurde nach Angaben von BEISENHERZ und Mitarbeitern (2) durchgeführt.

a) Methodik:

Zu 1,0 ml der zu untersuchenden Probe gibt man 0,2 ml einer 50 %igen Trichloressigsäure. Nach anschließender Zentrifugation (10 min/20 000 g) wird das Zentrifugat unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur in 2,5 ml Biuretreagenz gelöst. Nach 30 min. wird die Lösung mit Aqua dest. auf 5,0 ml aufgefüllt. Die Extinction bei einer Wellenlänge von 546 nm, $d = 2$ cm wird im Photometer nach Eppendorf gegen einen Leerwert (statt Eiweißlösung die gleiche Menge dest. Wasser) gemessen. Um die die Messung beeinflussenden Trübungen zu entfernen, wurde dem Biuretansatz nach der ersten Messung KCN in Mengen bis zu 30 mg zugesetzt. Nach spätestens 5 min. hat sich der Biuretkomplex vollständig entfärbt und die Extinction des farblosen Testansatzes wird erneut gemessen.

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgt nach folgender Gleichung:

$$F \cdot [(EM_1 - EM_2) - (EL_1 - EL_2)] = \text{mg Protein pro Testansatz}$$

Die Ergebnisse der Biuretmessung sind in Tab. 44 zusammengefaßt.

b) Ergebnisse:

Die Gesamteiweißgehalte der Extraktlösungen aus den einzelnen Extraktionsverfahren, die sich durch das verwendete Extraktionsmittel, Extraktionstemperatur, sowie durch die Extraktionszeit unterscheiden, habe ich wie folgt beurteilt:

Die Extremwerte des Gesamteiweißgehaltes werden ausgeklammert und von den restlichen Werten für jedes Extraktionsverfahren jeweils der Mittelwert ermittelt.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsverfahren in Bezug auf die zur Anwendung kommenden Extraktionsmittel, Veronalpuffer, Phosphatpuffer und physiol. Kochsalzlösung, wurde mittels physiol. Kochsalzlösung der geringste Gesamteiweißgehalt ermittelt. Die höchsten Gesamteiweißgehalte wurden mit Hilfe von Veronalpuffer als Extraktionsmittel erhalten. Bei Verwendung von Phosphatpuffer als Extraktionsmittel lagen die Werte für Gesamteiweiß zwischen denen der Extraktion mit physiol. Kochsalzlösung und der mit Veronalpuffer.

Tabelle 44

Gesamteiweißgehalt pro ml Extraktlösung in mg der Extraktionsverfahren.

Modell charge	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Ko nat	13,73	13,60	10,21	4,46	2,63	2,62	1,48	1,14	0,43	1,13	3,63	--	1,57	--	1,57
Ko 70°	3,23	--	4,72	2,71	2,27	-	-	1,14	0,78	1,13	1,97	0,87	1,22	0,96	1,20
Ko 115°	3,23	10,32	7,61	3,41	1,93	3,32	3,93	3,24	0,43	1,48	2,71	2,97	6,82	3,76	2,53
Nat 1,0	6,38	-	2,45	-	2,63	-	2,78	3,68	2,71	2,20	3,76	5,42	3,32	2,36	1,83
Nat 0,5	1,48	1,22	1,12	1,31	3,33	0,87	6,73	0,79	-	0,78	0,96	3,76	1,22	3,16	2,53
Nat 0,2	17,23	7,52	0,92	1,66	10,32	3,67	0,78	1,48	3,58	1,48	1,76	1,92	1,92	1,66	1,48
70° 2,0	8,83	5,77	4,65	3,41	39,20	-	3,23	2,53	6,73	3,93	1,31	10,62	10,32	2,71	-
70° 1,5	1,48	3,76	5,44	4,11	10,32	7,17	-	3,20	1,83	1,13	3,55	1,94	2,27	1,31	-
70° 1,0	3,58	5,07	4,36	7,96	4,37	13,82	-	1,05	1,13	2,18	1,31	1,33	1,22	1,31	1,38
70° 0,5	8,48	3,32	7,57	3,76	13,65	10,32	1,83	0,87	-	0,78	1,76	1,22	1,22	0,96	-
115° 2,0	-	-	-	4,11	3,32	6,82	8,13	6,73	6,73	2,18	3,06	4,02	6,12	4,11	3,58
115° 1,5	10,92	1,57	3,81	3,06	3,32	-	1,83	6,03	3,93	3,21	3,50	2,27	1,92	2,71	2,18
115° 1,0	3,67	8,75	5,77	2,01	1,22	-	2,88	6,73	2,53	1,13	3,51	2,62	2,62	1,66	2,88
115° 0,5	3,67	4,02	3,97	3,41	2,27	3,32	2,53	3,93	3,23	0,78	3,76	-	6,82	1,83	4,28

Zeichenerklärung siehe Seite 95!

Zeichenerklärung zu Tabelle 44

- A = Extraktion mit Veronalpuffer 24 Std. Zimmert.
- B = Extraktion mit Veronalpuffer 48 Std. Kühlschrank
- C = Extraktion mit Veronalpuffer 2 Std. Brutschrank
- D = Extraktion mit kochendem Veronalpuffer Zimmert.
- E = Extraktion mit kochendem Veronalpuffer Kühlschrank
- F = Extraktion mit kochendem Veronalpuffer Brutschrank
- G = Extraktion mit Phosphatpuffer 24 Std. Zimmert.
- H = Extraktion mit Phosphatpuffer 2 Std. Brutschrank
- I = Extraktion mit Phosphatpuffer 48 Std. Kühlschrank
- J = Extraktion nach SINEll
- K = Extraktion nach Fromm (Wasserbad)
- L = Extraktion nach Günther
- M = Extraktion nach Fromm (1 Woche Kühlschrank)
- N = Extraktion nach Kotter-Herrmann (Kühlschrank)
- O = Extraktion nach Kotter-Herrmann (Brutschrank)

Beim Vergleich der Extraktionszeiten innerhalb der Extraktionsverfahren erhält man auch die entsprechend höchsten Gesamteiweißgehalte in der Gruppe I. a) (48 Std. im Kühlschrank).

Der Versuch, die Löslichkeit des Eiweißes durch Zugabe von kochendem Veronalpuffer zu erhöhen, zeigte nicht den erwarteten Erfolg. Hier war das Verhältnis der Extraktionsdauer zur Höhe des Gesamteiweißgehaltes umgekehrt, je kürzer die Extraktionsdauer, umso höher lag der Gesamteiweißgehalt.

Auch bei den Gruppen 2 und 3 konnte durch die Anwendung einer 48-stündigen Extraktionsdauer der Anteil des gelösten Eiweißes im Extrakt nicht erhöht werden.

Nach den Ergebnissen der Biuretreaktion ist in den Extraktionslösungen aus dem verwendeten Untersuchungsmaterial mit der Anwesenheit von aufgeschlossenem Milcheiweiß zu rechnen.

Da dieser Gehalt an aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels der Senkungsreaktion im L.T. nicht eindeutig erfaßt werden konnte, wurden die Extraktlösungen der unterschiedlichen Extraktionsverfahren in der indirekten Hämagglutinationsreaktion nochmals geprüft.

a) 5. Durchführung der indirekten Hämagglutination:

Hammelblut wird mindestens 3 mal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen. Die Erythrozyten sind dann brauchbar, wenn keine Hämolyse zu beobachten ist. Das gewaschene Blut wird über Nacht im Kühlschrank ($4-6^{\circ}\text{C}$) gelagert.

5 ml gewaschene Hammelerythrozyten werden mit 17,5 ml physiol. Kochsalzlösung und unter tropfenweiser Zugabe mit 2,5 ml einer frisch angesetzten Tanninlösung versetzt. Die Erythrozytenaufschwemmung läßt man 15 min. bei Zimmertemperatur inkubieren. Nach 3-maligem Waschen mit physiol. Kochsalzlösung wird das Erythrozytensediment mit physiol. Kochsalzlösung auf 25 ml aufgefüllt.

Für die Sensibilisierung der Erythrozyten werden 5 ml einer 0,5 %-igen Milcheiweißlösung mit 10 Vol % gewaschener nicht mit Tannin behandelter Hammelerythrozyten versetzt, nach 15 min. abzentrifugiert und der klare Überstand weiter verwendet. Zu 5 ml so

behandelter Eiweißlösung werden 5 ml tanninbehandelte Hammelerythrozyten hinzugefügt, 2 Std. bei 37° C im Brutschrank inkubiert, anschließend abzentrifugiert und das Sediment sooft mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen, bis der Überstand klar ist. Das letzte Sediment wird dann mit physiol. Kochsalzlösung auf 20 ml aufgefüllt. Das Antiserum wird 30 min. bei 56° C im Wasserbad gehalten und zum Entfernen heterologer Agglutinine 3 mal 10 Vol % gewaschener, nicht mit Tannin behandelter Hammelerythrozyten versetzt. Nach dem Zentrifugieren wird das Serum abgossen und weiterverwendet. 1 ml Antiserum wird mit 0,5 ml Extrakt der fraglichen Probe versetzt, eine Std. bei 37° C im Brutschrank inkubiert, anschließend abzentrifugiert und der klare Überstand weiterverwendet.

In Hämagglutinationsröhrchen werden je 0,5 ml physiol. Kochsalzlösung vorgelegt. In das erste Röhrchen werden 0,5 ml vorbereitetes Antiserum zugegeben und durch Überpipettieren von jeweils 0,5 ml eine quadratische Verdünnungsreihe angelegt. (Positive Serumkontrolle) In der zweiten Reihe werden 0,5 ml des mit dem fraglichen Extrakt voradsorbierten Antiserums zu einer quadratischen Verdünnungsreihe austitriert. Die dritte Reihe stellt die "negative" Kontrolle zum Serumtiter dar. 0,5 ml eines Antiserums, an das vorher eine 2 %-ige Antigenlösung adsorbiert worden ist, werden ebenfalls quadratisch ausverdünnt. Die vierte Reihe dient als "positive Kontrolle" des Extraktes. 0,5 ml Antiserum, an das vorher Extrakt einer nicht fremdeiweißhaltigen Probe adsorbiert worden ist, werden austitriert.

Zu jedem Röhrchen der Verdünnungsreihen gibt man 0,1 ml der sensibilisierten Erythrozyten. Nach gründlicher Durchmischung werden die Röhrchen 1 Std. bei 37° C im Brutschrank gehalten, erneut aufgeschüttelt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die Beurteilung der Reaktion erfolgt nach folgendem Schema:

Bei negativer Hämagglutination sedimentieren die Erythrozyten in den tiefsten Punkt der Röhrchen und füllen eine engumgrenzte Zone aus (positiver Antigennachweis).

Bei positiver Hämagglutination haben sich die Agglutinate teppichartig über dem Boden des Röhrchens ausgebreitet. (negativer Antigennachweis).

Ist im Untersuchungsmaterial Fremdeiweiß enthalten, dann sind je nach der Konzentration des Fremdeiweißes im Extrakt die Antikörper teilweise oder vollständig verbraucht. Den sensibilisierten Erythrozyten fehlen die zur Agglutination notwendigen Antikörper und sie sedimentieren an den tiefsten Punkt des Röhrchens. Enthält jedoch das Untersuchungsmaterial kein Fremdeiweiß, dann agglutinieren die Antikörper des Antiserums mit dem an die Erythrozyten adsorbierten Antigen. Die Agglutinate breiten sich teppichartig am Boden des Röhrchens aus.

Die Untersuchungen wurden im Gegensatz zur "klassischen" indirekten Hämagglutination mit formalinisierten sensibilisierten Hammelerythrozyten durchgeführt.

Für die Formalinisierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten wird Hammelblut zu gleichen Teilen in Alserverscher Lösung aufgefangen und bis zu seiner Verwendung bei 4° C aufbewahrt. Eine 37 %-ige Formalinlösung wird mit 1n NaOH auf ph 7 - 7,5 eingestellt und mit physiol. Kochsalzlösung auf eine 3 %-ige Konzentration gebracht.

Tannin wird 1 : 1000 mit physiol. Kochsalzlösung gelöst. Kurz vor der Verwendung wird die endgültige Verdünnung 1 : 40 000 hergestellt (mit ph 7,2 gepufferter Kochsalzlösung).

Für die Sensibilisierung werden Erythrozyten 3 mal mit gepufferter Kochsalzlösung gewaschen, eine 8 %ige Erythrozytensuspension mit gleichem Volumenanteil 3 %iger Formalinlösung gemischt und 18 Std. bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird das Gemisch 4 mal mit gepufferter physiol. Kochsalzlösung gewaschen. Mit gepufferter physiol. Kochsalzlösung (ph 7,2) werden die gewaschenen, formalinisierten Erythrozyten zu einer 3,3 %igen Zellsuspension verdünnt und mit gleichen Volumenteilen der 1 : 40 000 verdünnten Tanninlösung versetzt. Diese Erythrozytenaufschwemmung wird 30 min. bei 37° C inkubiert, zentrifugiert und das Zentrifugat 2 mal mit gepufferter physiol. Kochsalzlösung gewaschen. Zur Sensibilisierung wird das letzte Zentrifugat mit gepufferter physiol. Kochsalzlösung (ph 6,4) auf eine 3,3 %ige Zellsuspension verdünnt, mit gleichen Volumenteilen einer 0,05 %igen aufgeschlossenen Milcheiweißlösung versetzt und unter öfterem Umrühren 1 Std. bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die sensibilisierten Erythrozyten zentrifugiert und das Zentrifugat mit gepufferter physiol. Kochsalzlösung gewaschen.

Die sensibilisierten, gewaschenen Erythrozyten werden in 10 %iger Aufschwemmung mit 4 % normalem Kaninchen-serum sowie 10 % Saccharose in Ampullen gefüllt, lyophilisiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

In Abweichung der Durchführung der "klassischen" indirekten Hämagglutination wird bei der mit formalinisierten sensibilisierten Hammelerythrozyten durchgeführten indirekten Hämagglutination die Reaktion wie folgt angesetzt:

Für die positive Serumkontrolle wird in Agglutinationsröhrchen (100 mal 14 mm) 0,5 ml Antiserum quadratisch ausverdünnt. Zu jedem Röhrchen werden 0,06 - 0,065 ml (1 Tropfen einer 1-ml-Pipette) einer 2,5 %igen Aufschwemmung der sensibilisierten Erythrozyten gegeben. Anschließend werden die Röhrchen gut aufgeschüttelt und 2 Std. bei Zimmertemperatur oder 24 Std. im Kühlschrank stehengelassen.

Für die negative Serumkontrolle werden 1,0 ml Antiserum mit 0,5 ml einer 2,5 %igen homologen aufgeschlossenen Milcheiweißlösung 1 Std. bei 37° C inkubiert, abzentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes quadratisch ausverdünnt. Den Verdünnungen wird jeweils 1 Tropfen sensibilisierte Erythrozyten zugegeben.

Die Beurteilung der Reaktion erfolgt durch Betrachten der "Erythrozytensedimente" am Boden der Röhrchen. Mit Hilfe eines um 45° geneigten Spiegels in einem Reagenzglasständer läßt sich die Reaktion leicht ablesen. Als doppelt positiv beurteilt man die Reaktionen, bei denen der Boden des Röhrchens mit einem gleichmäßigen "Agglutinateppich" bedeckt und die Ränder des Teppichs glatt bzw. leicht eingerissen sind.

"Einfach positiv" ist die Reaktion bei schmalem Erythrozytenring um einen glatten Zellteppich. Bei negativer Reaktion zeigt sich am Röhrchenboden ein scharf abgesetzter Ring bzw. die bekannte Knopfbildung der nicht agglutinierten Erythrozyten.

In Tabelle 45 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die unter Verwendung der Extraktion mit Veronalpuffer (ph 8,4) 2 Std. bei 37° C im Brutschrank erhalten worden sind.

Tabelle 46 zeigt die Untersuchungsergebnisse, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen mit Veronalpuffer (ph 8,4) 48 Std. bei 4° C im Kühlschrank extrahiert worden war.

Tabelle 47 zeigt die Untersuchungsergebnisse mit einem Extrakt, bei dem das Antigen mit Veronalpuffer (ph 8,4) 24 Std. bei Zimmertemperatur extrahiert wurde.

Tabelle 48 enthält die Untersuchungsergebnisse mit einem Extrakt, bei dem das Antigen 24 Std. mit kochendem Veronalpuffer (ph 8,4) zur Extraktion angesetzt worden war.

Die in Tabelle 49 zusammengestellten Untersuchungsergebnisse wurden mit einem Extrakt erhalten, bei dem das Antigen 24 Std. mit Phosphatpuffer (ph 4,8) zur Extraktion angesetzt worden war.

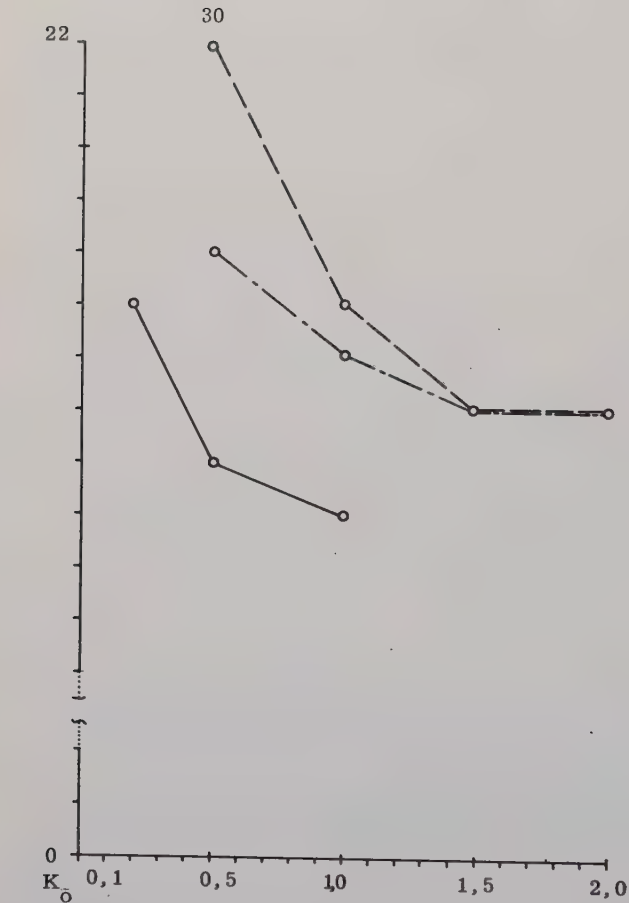
Tabelle 50 zeigt die Untersuchungsergebnisse, die mit einem Extrakt erhalten wurden, bei dem das Antigen 48 Std. mit Phosphatpuffer (ph 4,8) bei 4° C im Kühlschrank zur Extraktion angesetzt worden war.

b) Ergebnisse:

Die Ergebnisse wurden zusammenfassend graphisch dargestellt. (Darstellung 1-6).

Beim Vergleich der Extraktionsdauer innerhalb eines Extraktionsverfahrens mit einem Lösungsmittel zeigt

Eichkurve 1 (Extraktion mit Veronalpuffer
2 Std. Brutschrank)

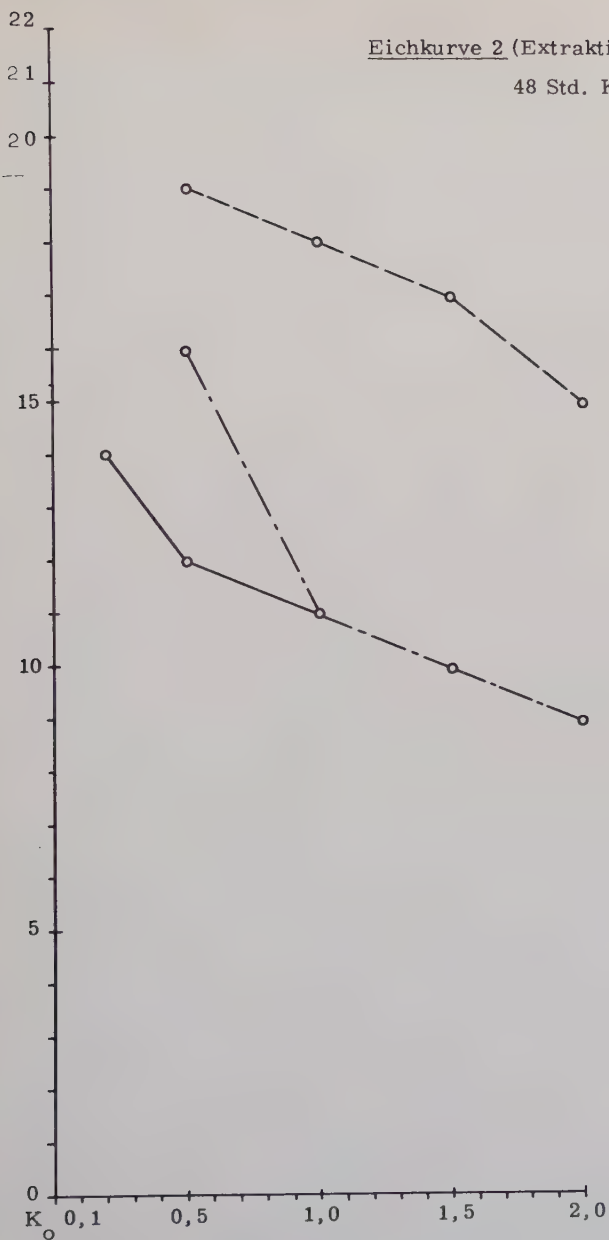


Zeichenerklärung:

- = nicht erhitzte Modellcharge
- . - = auf 70°C erhitzte Modellcharge
- = auf 115°C erhitzte Modellcharge
- K_O = Kontrolle

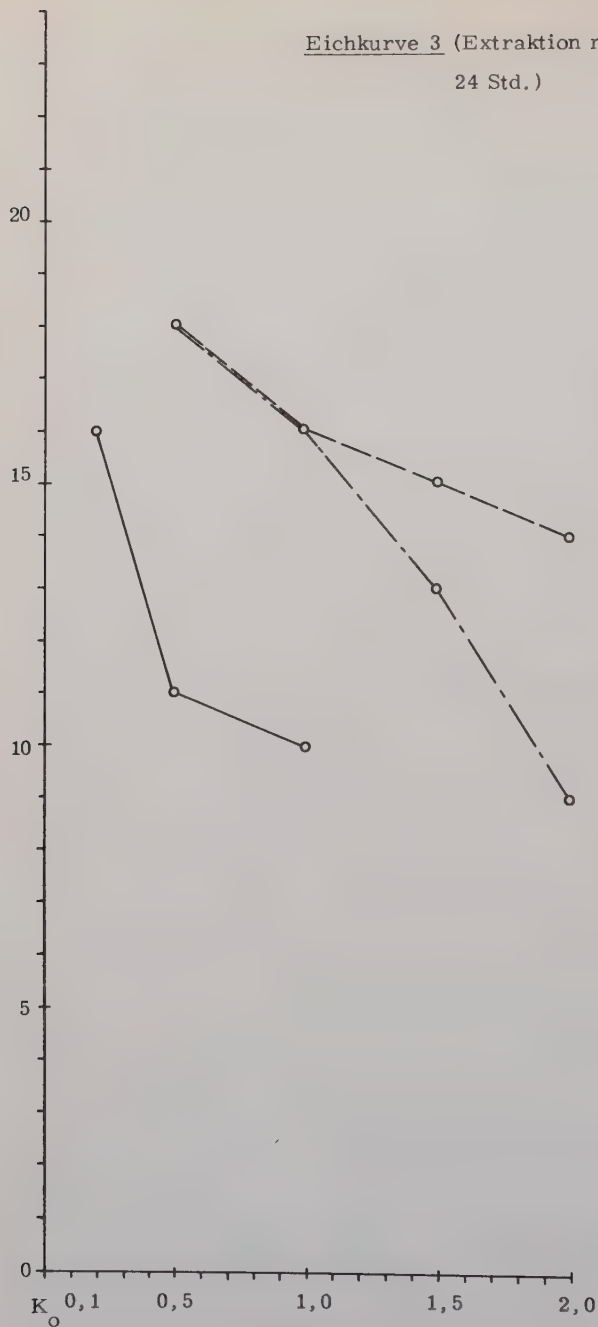
0,1 - 2,0 = Konzentrationen des
Milcheiweißzusatzes
0 - 30 = Titerstufen

Eichkurve 2 (Extraktion mit Veronal;
48 Std. Kühlschrank)



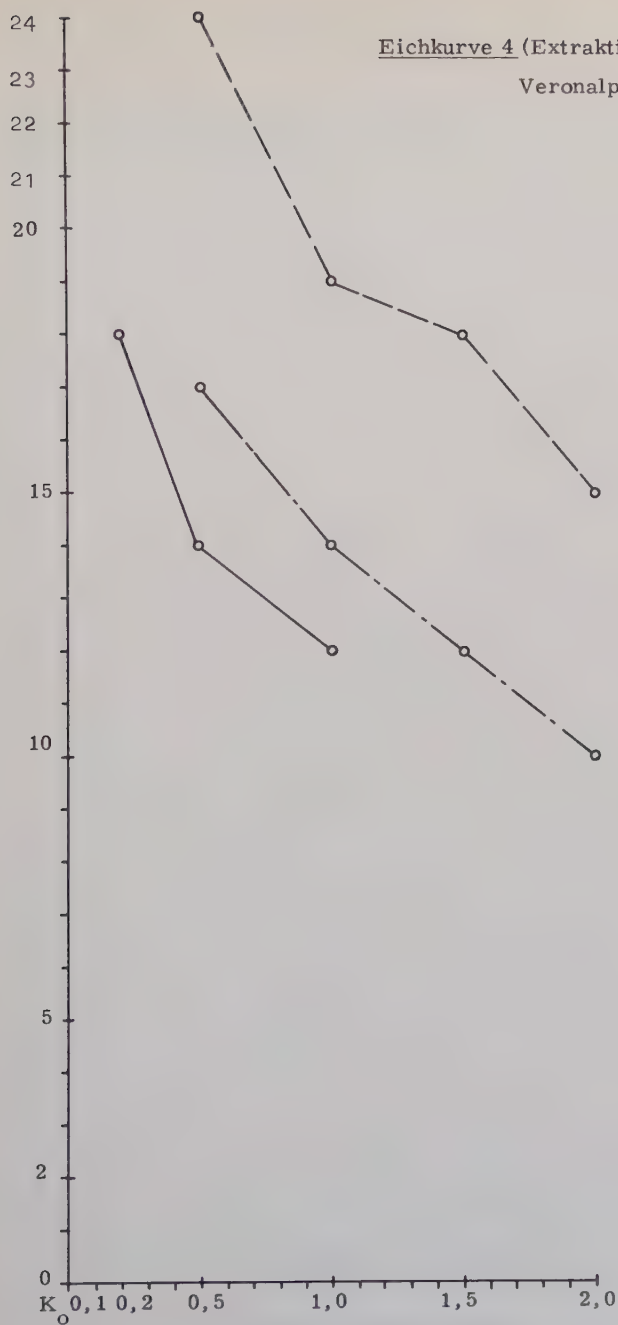
Siehe Zeichenerklärung!

Eichkurve 3 (Extraktion mit Veronalpuffer
24 Std.)



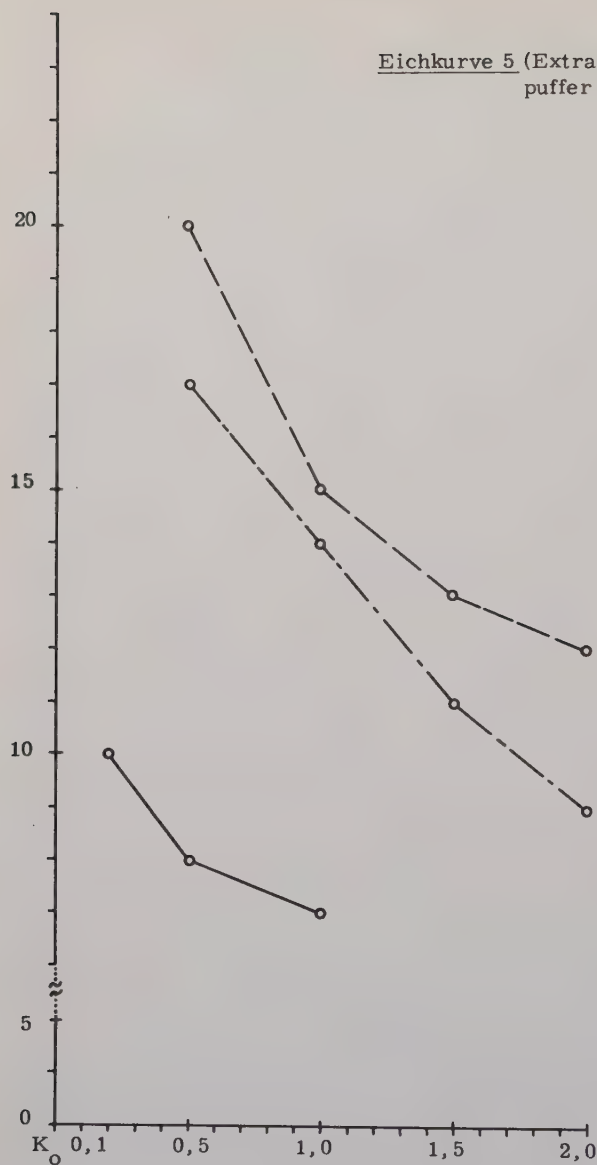
Siehe Zeichenerklärung!

Eichkurve 4 (Extraktion mit kochendem
Veronalpuffer 24 Std.)



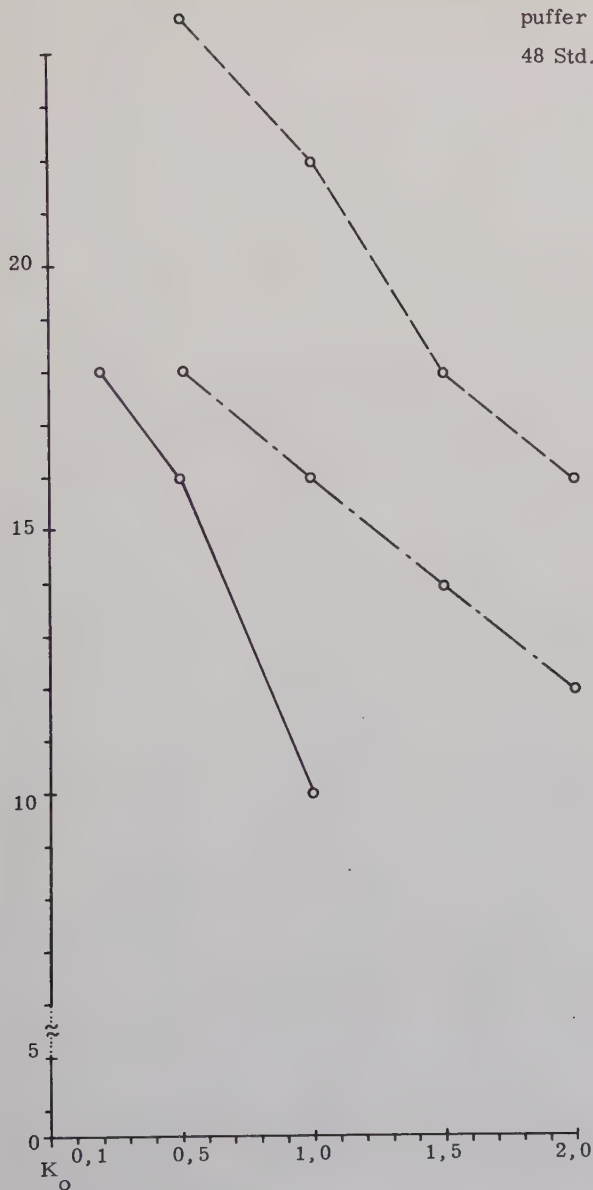
Siehe Zeichenerklärung!

Eichkurve 5 (Extraktion mit Phosphat-
puffer 24 Std.)



Siehe Zeichenerklärung!

Eichkurve 6 (Extraktion mit Phosphat-
puffer
48 Std. Kühlschrank)



Siehe Zeichenerklärung!

Tabelle 45

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261324	523648	
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 9 Mil.
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Nat 0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 1 Mil.
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 9 Mil.

Zeichenerklärung auf Seite 72!

Tabelle 46

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Latraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren
mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648	1046296
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++
bis 5 Mil.

-105-

Siehe Zeichenerklärung auf Seite 72!

Tabelle 47

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren
mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648	1046296
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 48

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-
Nat 0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 3 Mil.

Tabelle 49

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648	1047296
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Siehe Zeichenerklärung auf Seite 72!

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

-109-

sich, daß die längere Extraktionszeit grundsätzlich überlegen ist. Diese Beobachtung wurde sowohl bei der Verwendung der Extraktionslösungsmittel nativ und kochend und physiol. Kochsalzlösung gemacht. Bei der Verwendung von Phosphatpuffer zeigte eine 24-stündige Extraktion bessere Ergebnisse als die 48-stündige (Tab. 50). Die 24-stündige Extraktion bei Zimmertemperatur mit nativem Veronalpuffer (Tab. 49) war der mit kochendem Veronalpuffer bei gleicher Extraktionszeit (Tab. 48) überlegen. Beim Vergleich der Extraktionslösungsmittel wurde in Abhängigkeit zur Extraktionsdauer mit Veronalpuffer gegenüber Phosphatpuffer und physiol. Kochsalzlösung die besten Extraktionsergebnisse erzielt.

In Tabelle 51 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die mittels der Extraktion nach SINELL und KLUGE-WILM (59) gewonnen worden waren. Das lyophilisierte Untersuchungsmaterial wurde 1:2 mit kochender physiol. Kochsalzlösung 24 Std. extrahiert, Tabelle 52 faßt die Untersuchungsergebnisse zusammen, die mit einem Extrakt gewonnen wurden, bei dem das Antigen 1:2 mit physiol. Kochsalzlösung versetzt 90 min. bei 37°C im Brutschrank extrahiert worden war (39). Tabelle 53 zeigt die Untersuchungsergebnisse des Extraktionsverfahrens nach KOTTER und HERRMANN (39) nach 48-stündiger Extraktion bei 4°C im Kühlschrank.

Tabelle 51

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648	1047296
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 5 Mil.
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Nat 0,2	++++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 3 Mil.
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

-111-

Tabelle 52

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der indirekten Hamagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648	1047296
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Nat 0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 53

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes der Extraktlösungen verschiedener Extraktionsverfahren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	9192	16364	32728	65456	130912	261824	523648
pos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 5 Mil.
neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ko nat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Nat 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Nat 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-
Nat 0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
Ko 70°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-
70° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
70° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
70° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
70° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ko 115°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-
115° 2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
115° 1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
115° 1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
115° 0,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ bis 3 Mil.

Siehe Zeichenerklärung auf Seite 72!

Besprechung der Ergebnisse:

Bei Verwendung des Extraktionsverfahrens nach KOTTER und HERRMANN (39) bei 48-stündiger Extraktion im Kühlschrank war grob zwischen den unterschiedlichen Milcheiweiß-haltigen Zusätzen in allen geprüften Modellchargen zu differenzieren (Tabelle 53). Bei dem gleichen Extraktionsverfahren, jedoch nur eine 90 min. Extraktion, sowie bei dem Extraktionsverfahren nach SINELL (59) reagierten die Kontrollchargen fast mit dem gleichen Hemmtiter wie die Milcheiweiß-haltigen Chargen (Tabelle 51).

Bei der Extraktion mit Phosphatpuffer und einer Extraktionsdauer von 48 Std. konnte zwischen den Milcheiweißkonzentrationen 0,2 und 1,0 % im nativen und 0,5 und 2 % im 70°C erhitzten Material differenziert werden (Tab. 50)

Bei der Extraktion mit Phosphatpuffer und einer Extraktionsdauer von 24 Std. bei Zimmertemperatur konnte bei den 70° C und 115° C erhitzten Modellchargen eindeutig zwischen den Konzentrationen 0,5; 1,0; 1,5 und 2 % unterschieden werden (Tab.49)

Bei der Extraktion mit Veronalpuffer und einer Extraktionsdauer von 2 Std. war eine Differenzierung zwischen den einzelnen Konzentrationen bei den nativen, auf 70° C erhitzten, sowie bei den auf 115° C erhitzten Modellchargen möglich (Tabelle 45).

Bei der Extraktion mit Veronalpuffer und einer 48-stündigen Extraktionsdauer im Kühlschrank war grob zwischen den Konzentrationen 0,2; 0,5 und 1,0 % bei den nativen Modellchargen und zwischen den Konzentrationen 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 % bei den auf 115° C

erhitzten Modellchargen zu unterscheiden (Tab. 46).
Bei der Extraktion mit Veronalpuffer und einer
Extraktionsdauer von 24 Std. ließ sich zwischen allen
Konzentrationen der nativen, der auf 70° C erhitzten
sowie der auf 115° C erhitzten Modellshargen
differenzieren (Tabelle 47).

Bei der Extraktion mit kochendem Veronalpuffer und
einer Extraktionsdauer von 24 Std. war zwischen den
Konzentrationen 0,2; 0,5 und 1,0 % bei den nativen
Chargen und zwischen den Konzentrationen 0,5; 1,0;
1,5 und 2,0 % bei den auf 70° C erhitzten Modell-
chargen zu differenzieren (Tabelle 48).

D. DISKUSSION

Bei der Konservierung der mit aufgeschlossenem Milcheiweiß sensibilisierten Hammelerythrozyten mit Cialit wurde bereits nach 5 Tagen eine Aktivitätsschwächung beobachtet. Nach 15 Tagen war der Aktivitätsverlust so hoch, daß sich eine weitere Untersuchung erübrigte, da außerdem die Spezifität und Empfindlichkeit der Reaktion bereits nach 15 Tagen durch das Auftreten leichter Hämolyse beeinflußt worden ist. Auch unterschiedliche Cialitkonzentrationen führten nicht zu einer Verbesserung der konservierenden Wirkung. In eigenen Untersuchungen konnten somit die von KOTTER und HERRMANN (40) gemachten Beobachtungen, daß sensibilisierte Erythrozyten mit Cialit 1:10 000 versetzt über 10 Wochen ohne Beeinträchtigung der Reaktion aufbewahrt werden können, nicht bestätigt werden. Es ist anzunehmen, daß die sehr frühe Reaktionsbeeinträchtigung ähnlich wie bei den mit Nipagin konservierten sensibilisierten Erythrozyten (40) auf Konzentrationsverschiebungen im Sensibilisierungsgemisch zurückzuführen sind. Auch das Auffangen des Hammelblutes in Kautelen führte nicht zur Verbesserung der Reaktionsergebnisse.

Gleiche Beobachtungen wurden mit den Konservierungsmitteln Merthiolat und Baycovin gemacht. Zwar kam es bei der Konservierung der sensibilisierten Erythrozyten mit Baycovin zu einem geringeren Aktivitätsverlust gegenüber den mit Cialit konservierten Erythrozyten und eine deutliche Hämolyse war erst nach 42 Tagen zu beobachten, doch war bereits zu diesem Zeitpunkt der

Aktivitäts- und Spezifitätsverlust der sensibilisierten Hammelerythrozyten so hoch, daß die Konservierung mit Baycovin für eine längere Haltbarkeit nicht ausreichend war. Auch durch die Konservierung der sensibilisierten Erythrozyten mit Merthiolat wurde ihre Haltbarkeit nicht verbessert.

Mit Baycovin und Merthiolat konservierte Hammelerythrozyten können unter Beachtung eines geringen Aktivitätsverlustes 15 Tage nach dem Ansatz in der indirekten Hämagglutination benutzt werden. Eine Konservierung über diesen Zeitpunkt hinaus ruft so erhebliche Veränderungen an den sensibilisierten Erythrozyten hervor, daß Empfindlichkeit und Spezifität sehr stark beeinflußt werden.

Die nicht befriedigenden Versuche zur Konservierung der sensibilisierten Erythrozyten mit handelsüblichen Konservierungsmitteln veranlaßte zu weiteren Versuchen, die Erythrozyten durch Latexpartikel zu ersetzen. Ermutigt durch die Untersuchungen durch FROMM (17), der Milcheiweißbeimischungen zwar gelegentlich in Konzentrationen von 0,1 - 0,3 %, aber sicher in Konzentrationen ab 0,4 % in hocherhitztem Material mit Hilfe sensibilisierter Latexpartikel nachweisen konnte, wurde versucht, diese Ergebnisse durch eigene Untersuchungen zu reproduzieren und durch Änderung der Untersuchungsmethoden zu verbessern.

Untersuchungsergebnisse von FROMM (17) konnten jedoch in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Zwischen den zur Untersuchung kommenden und mit verschiedenen Konzentrationen an aufgeschlossenem Milcheiweiß versetzten Modellchargen gelang nur subjektiv der qualitative Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß. Beim Vergleich der Reaktionsergebnisse von

sicher Milcheiweiß-haltigen Material ließ sich der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß selbst qualitativ nicht eindeutig führen. Zwar war eine grob quantitative Differenzierung aufgrund der Reaktionsergebnisse zwischen den verarbeiteten Milcheiweißkonzentrationen 0,5; 1,0 und 2,0 % möglich, jedoch beim Vergleich mit den Reaktionsergebnissen der Kontrollchargen war nur der Nachweis von Milcheiweiß ab 2 % zu führen. Geringere Konzentrationen ließen sich nicht erfassen.

Der Vorteil der Verwendung von Kunststoffpartikeln gegenüber nativen Erythrozyten, daß bei der Reaktion mit bekannten Größen und Mengen der mit Antigen beladenen Partikel gearbeitet werden kann, führte nicht zu einer Verbesserung der Reaktionsergebnisse gegenüber denen aus der "klassischen" indirekten Hämagglutination. Anscheinend ist die Labilität der Kunststoffpartikel beim Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen so groß, daß sie sich für derartige Nachweisreaktionen nicht eignen. Ihre Labilität und Anfälligkeit gegenüber einwertigen Kationen, sowie ihre durch die Oberflächenspannung von Reaktionsmedien beeinflusste Kohäsion der Partikel sind wahrscheinlich so stark, daß sie nicht durch Eiweiß als Schutzkolloid aufgehoben werden konnten.

Latexpartikel zeigten gegenüber sensibilisierten nativen Erythrozyten eine geringere Reaktionsaktivität, so daß bei Antiseren, die in der Reaktion mit nativen sensibilisierten Hammelerythrozyten einen hohen Antikörpertiter besaßen, bei der Reaktion mit Latexpartikeln ein starker Titerverlust beobachtet werden konnte.

Bei der anfänglich "hohen Reaktionsaktivität" der Latexpartikel mit einem Antiserum, das ohne vorangegangene Dialyse verwendet wurde, ist wahrscheinlich ein Großteil der erfolgten "positiven" Agglutination auf unspezifische Spontanagglutinationen zurückzuführen. Mit dem später verwendeten dialysierten Antiserum konnte bei den Untersuchungen nie wieder eine ähnliche Reaktionsaktivität beobachtet werden. Die Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, daß besonders in den für die Untersuchung benutzten Extraktionslösungen aus den Fleischerzeugnissen die "Fremdeinflüsse" der Verwendung von Latexpartikeln für serologische Nachweisreaktionen in der Lebensmittelüberwachung entgegenstehen.

Abgesehen von diesen "Fehlreaktionen", die sich unter Umständen durch entsprechende vorsichtige Aufbereitung des Untersuchungsmaterials ausschließen lassen könnten, steht unter Betrachtung der Wirtschaftlichkeit serologischer Reaktionen der Aufwand an Materialkosten, Zeit und Arbeitsaufwand in keinem Verhältnis, zumal mit anderen serologischen Reaktionen bessere Ergebnisse "billiger" erreicht werden können.

Um die beobachtete Labilität der Latexpartikel auszuschließen, wurde versucht, die Latexpartikel durch Tusche zu ersetzen, da ERILL und GRAS (14) mit Tusche ähnliche bis gleiche Reaktionsergebnisse wie mit Latexpartikeln erreichen konnten.

Die in Anlehnung an die von ERILL und GRAS (14) beschriebene Methodik durchgeführten Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Aktivität der Tuschepartikel

wesentlich geringer als die der Latexpartikel war. Somit konnte die Feststellung von ERILL und GRAS (14) bestätigt werden, daß zwar die Labilität der Tusche-partikel wesentlich geringer als die der Latexpartikel, jedoch ihre Empfindlichkeit wesentlich geringer ist.

Die geradezu "paradoxen" Reaktionen im Latextest gaben Veranlassung zur Prüfung verschiedener Extraktionsmethoden. Abgesehen von Fehlern in der Methodik des Nachweisverfahrens mit Latexpartikeln war es notwendig zu prüfen, inwieweit mit Hilfe verschiedener Extraktionsverfahren die Extrahierbarkeit des koagulierten Fremdeiweißes möglich ist und sich die Reaktionsergebnisse des serologischen Nachweises von aufgeschlossenem Milcheiweiß in erhitzten und hoch-erhitzten Fleischerzeugnissen verbessern lassen. Wie bereits früher festgestellt (59,29) wird durch Erhitzung nicht die serologische Aktivität der Reaktion beeinträchtigt, sondern durch das Fehlen einer ausreichenden Menge an Antigen werden negative Reaktionsergebnisse vorgetäuscht, da das koagulierte bis fast vollständig denaturierte Eiweiß nicht in ausreichendem Maße zu extrahieren ist.

Durch Einschalten der Lyophilisation wird das koagulierte Eiweiß in einen geeigneteren Lösungszustand gebracht (49). Durch vorausgegangene Lyophilisierung des Untersuchungsmaterials konnte HERRMANN (29) die Untersuchungsergebnisse beim Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in handelsüblichem Frühstücksfleisch unter Verwendung der in der Literatur beschriebenen verschiedenen Extraktionsmethoden eindeutig verbessern.

In eigenen Untersuchungen wurde ebenfalls lyophilisiertes Material geprüft. Beim Vergleich der verschiedenen Extraktionsverfahren in Bezug auf die zur Anwendung kommenden Extraktionsmittel: Veronalpuffer, Phosphatpuffer und physiol. Kochsalzlösung wurde bei Verwendung von Veronalpuffer in den Extraktionslösungen die höchsten Gesamteiweißgehalte ermittelt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, daß besonders bei der Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß die Beschaffenheit des zur Anwendung kommenden Extraktionsmittels von Bedeutung ist. Erst in zweiter Linie ist die Menge des extrahierten Eiweißes von der Extraktionszeit abhängig, obwohl grundsätzlich eine längere Extraktionszeit einen höheren Gesamteiweißgehalt der Extrakte ergibt. Beim Vergleich der Ergebnisse wird deutlich, daß nicht allein die Extraktionsdauer für den höheren Gesamteiweißgehalt maßgebend ist, sondern nur in Verbindung mit dem entsprechenden Extraktionsmittel höhere Gesamteiweißgehalte extrahiert werden können. Eine 48-stündige Extraktion mit physiol. Kochsalzlösung oder Phosphatpuffer als Extraktionsmittel erhöhte den Anteil des gelösten Milcheiweißes im Extrakt nicht, während bei der 48-stündigen Extraktion unter Verwendung von Veronalpuffer als Extraktionsmittel der Gesamteiweißgehalt im Extrakt erheblich größer war. Neben Extraktionsmittel und Extraktionsdauer ist jedoch auch die Extraktionstemperatur zu beachten. Möglicherweise überzieht das Fett bei Temperaturen von 40° C die fein zerkleinerten mit Milcheiweiß gemischten Partikel wie ein Film und verhindert eine ausreichende Extraktion der Proteine, so daß der durch die auf Grund einer längeren Extraktion erwartete hohe Eiweißgehalt

nach der Zentrifugation im Extraktionsüberstand nicht ermittelt werden konnte. Diese Vermutung kann die Ursache dafür sein, daß durch die Extraktion von 24 Std. bei Zimmertemperatur selbst mit dem weniger geeigneten Extraktionsmittel Phosphatpuffer gegenüber der Veronalpufferextraktion in der Kälte höhere Gesamteiweißgehalte festgestellt werden konnten. Es bleibt zu prüfen, ob sich die Ergebnisse durch anhaltendes Rühren des Extraktes während der Extraktion in der Kälte verbessern ließen.

Die Löslichkeit des Milcheiweißes konnte durch Zugabe von kochendem Veronalpuffer bzw. kochender physiol. Kochsalzlösung $\frac{1}{10}$ (48,51) nicht signifikant erhöht werden. Hier war das Verhältnis: Extraktionsdauer zu Höhe des Gesamteiweißgehaltes gerade umgekehrt, denn je kürzer extrahiert wurde, umso höher war der Gesamteiweißgehalt in den Extrakten. Die mit dieser Extraktionsmethode von KLUGE-WILM (37) sowie SINELL und KLUGE-WILM (59) erzielten optimalen Gesamteiweißgehalte aus dem Untersuchungsmaterial konnten nicht gefunden werden. Die Zugabe eines kochenden Extraktionsmittels führte wahrscheinlich zu einer Vervollständigung der Denaturierung des im Untersuchungsmaterial enthaltenen Milcheiweißes, so daß der Anteil des noch nicht vollständig denaturierten Milcheiweißzusatzes verringert wird.

Beim Vergleich der in der Literatur für den serologischen Nachweis von Fremdeiweiß beschriebenen Extraktionsmethoden (59,20,39,17) konnte grundsätzlich eine Erhöhung des Gesamteiweißgehaltes in Abhängigkeit zur Extraktionsdauer festgestellt werden. Menge des Ausgangsmaterials, Zerkleinerungsgrad der Extraktionslösung nicht wesentlich.

Bei der Prüfung der mit den verschiedenen Extraktionsverfahren erhaltenen Extraktionslösungen mittels der indirekten Hämagglutination mit formalinisierten Hammelerythrozyten zeigte sich, daß sowohl in nativen, in bis auf 70°C (Kerntemperatur) sowie in bis auf 115°C (Kerntemperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial genügend koaguliertes Eiweiß in Lösung geht, sodaß deutlich zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen des Milcheiweißzusatzes differenziert werden konnte. Die Reaktionsergebnisse der indirekten Hämagglutination mit sensibilisierten Hammelerythrozyten unterstreichen die Ergebnisse der Bestimmung der Gesamteiweißgehalte mittels der Biuretreaktion. Die Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen ist in Abhängigkeit zum verwendeten Lösungsmittel und der Extraktionsdauer sowohl beim nicht erhitzten, als auch beim hocherhitzten Material deutlich zu führen. Zwischen den verschiedenen Milcheiweißkonzentrationen des Untersuchungsmaterials konnte dann besonders eindeutig differenziert werden, wenn die Proben mit Veronalpuffer (ph 8,4) 24 Std. bei Zimmertemperatur extrahiert worden waren.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Literatur über die serologischen Nachweismethoden für aufgeschlossenes Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen sowie über die Konservierungsmethoden der Erythrozyten wird besprochen.
2. Cialit, Baycovin und Merthiolat werden auf ihre Eignung zur Konservierung mit Milcheiweiß sensibilisierter Hammelerythrozyten überprüft, wobei die mit Milcheiweiß sensibilisierten Hammelerythrozyten nach ihrer Konservierung mit Merthiolat, sowie Baycovin 15 Tage zur Durchführung der indirekten Hämagglutinationsreaktion benutzt werden konnten.
3. Für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen mittels Latexpartikel wird ein Versuchsprotokoll in Anlehnung an FROMM (17) beschrieben.
4. Latexpartikel konnten in der indirekten Hämagglutination durch Tuscheartikel ersetzt werden.
5. Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in nativen, bis auf 70° C sowie bis auf 115° C erhitzten Modellwürsten, konnte selbst qualitativ mit Hilfe des Latextestes nicht eindeutig geführt werden.
6. Verschiedene Extraktionsverfahren sowie Extraktionsmittel wurden auf ihre Eignung zur Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß geprüft und eine 24-stündige Extraktion mit Veronalpuffer (ph 8,4) als am besten geeignet befunden.
7. Die Gesamteiweißgehalte der Extraktionslösungen mit Hilfe verschiedener Extraktionsverfahren wurden mittels der Biuretreaktion bestimmt, und die Ergebnisse durch Prüfung der Extrakte in der indirekten Hämagglutination mit formalinisierten sensibilisierten Hammelerythrozyten geprüft.

E. S U M M A R Y

1. The Literature, dealing with the serological methods of proof disintegrated milk protein in meat products as well as methods of preservation for red blood cells is discussed.
2. Cialit, Merthiolat and Baycovin are examined for their applicability for preservation of mutton-red-blood cells sensitivitized by milk protein; after their preservation with Merthiolat and Baycovin the mutton red blood cells sensitivitized by the milk protein, could be used for the realization of the indirect hemagglutination reaction during 15 days.
3. For the proof of desintegrated milk protein by help of Latex particles in meat products an experiment record with reference to FROMM (17) is described.
4. Latex particles could not be substituted by Indian ink partikles in the indirect hemagglutination.
5. The proof of disintegrated milk protein in native model sausages and sausages that have been heated to 70°C as to 115°C, could not be furnished definitely even in quality.
6. Various extraction techniques as well as extraction agents have been examined for their applicability for the extraction of disintegrated milk protein. An extraction, taking 24 hours, with Veronal-puffer (ph 8,4) has been thought the most suitable.
7. The total protein concentrations of the extraction severances have been accertained by help of different extraction techniques through Biuret-reaction and the results have been checked by an analysis of the extractas examined in the indirect hemagglutination with formalinized and sensitivitized mutton red blood cells.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aschaffenburg, R.: Variants of milkproteins and their pattern of inheritance.
J.Dairy Sci.48 (1965), 129.
2. Beisenherz, G., H.J. Botze, T. Bucher, I. Czok, K.H. Gabarde, F. Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase, u. Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z.Naturforschung 8b(1953), 555.
3. Boyden, S.V.: The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein Sera.
J, Exper. Med. 93(1951), 107.
4. Boyden, S.V. und P. Grabar: Role des lipides dans la sensibilisation des erythrocytes par les constituants de la tubercule.
Ann. Inst. Pasteur 87 (1954), 257.
5. Catsimopoulos, N. und E.W. Meyer: Immunochemical studies of Soybean Proteins.
J. Agr. Food chemical Vol. 16(1968), 128.
6. Cheng, T.H.: Studies on immunisation against plague. The method of the hemagglutination test and some observations on the antigen.
J. Immunol. 69(1952), 587.

7. Coons, A.H. und M. Kaplan: Lokalization of antigen in tissue cells.
II. Improvement in a method of the deduction of antigen by means of fluorescent antibody.
J. Exper. 91 (1950), 1.
8. Cox, C.D. und B. Fingerhut: Über die Formalinisierung sensibilisierter Hammelerythrozyten.
J. Lab. Clin. Med. 48 (1956), 298.
9. Czismas, L.: Konservierung sensibilisierter Hammelerythrozyten mittels Formalin.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 103 (1960), 157.
10. Daniel, T. M. und J.G.M. Weyand und A.B. Stavitzky:
Preparation on formalinized cells for Hemagglutination.
J. Immun. 96 (1963), 741.
11. Darcy, D.A.: A quantitative application of the agar-diffusion plate: The estimation of specific proteins in serum.
Immunol. 3 (1960), 325.
12. Degenkolb, E. und M. Hingerle: Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 241.
13. Degenkolb, E. und M. Hingerle: Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 73.
14. Erill, S. und J. Gras: A serologic method using charcoal particles from commercial india ink.
Path. Microbiol. 36 (1970), 173-178.

15. Flick, J.A.: Use of formalin-Treated Red Cells for the study of Influenza A Virus Hemagglutination-Activity.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)
68 (1948), 448.
16. Fromm, G., I. Langheld und J. Wurziger: Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischkonserven.
Arch. Hyg. 148 (1964), 244.
17. Fromm, G.: Zum immunologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischkonserven.
Arch. Hyg. 151 (1964), 702.
18. Fulthorpe, A.J.: Agglutination of Sheep Erythrocytes sensitized with Salmonella Polysaccharides.
Path. Bact. 68 (1954), 315.
19. Grabar, P. und C.A. Williams: Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines.
Biochim. Biophys. Acta 10 (1953), 193.
20. Günther, H.: Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 97 und 128.
21. Hanson, I.A.: Immunological technique for the detection of milk proteins in food products.
Nord. Vet. 16 (1964), 201.
22. Haurowitz, F.: Struktur und Wirkungsweise der Antikörper.
Naturwiss. 56 (1969), 189.
23. Hayward, B.J. und R. Augustin: Quantitative gel-diffusion methods for assay of antigens and antibodies.
Int. Arch. Allergy. 11 (1957), 192.

24. Heeschen, W.: Versuche zur Anwendung eines modifizierten Latextestes in der serologischen Diagnose der Rinderleukose.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 71 (1964), 257.
25. Heidelberger, M.: Quantitative absolute methods in the study of antigen-antibody reactions.
Bact. Rev. 3 (1949), 49.
26. Hellmann, E. und E. Quentin: Zum Nachweis der Verarbeitung von frischem Hühnereiklar in Brühwürsten mit Hilfe der Fräzipitationsreaktion.
Berlin. München. Tierärztl. Wschr. 22 (1968) 444.
27. Herrmann, Ch. und Ch. Merkle: Formalinisierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten.
Arch. Lebensmittelhyg. 9 (1971).
28. Herrmann, Ch., D. Holpert und G. Pfeiffer: Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren mit Hilfe fluoreszierender Antikörper.
Arch. Lebensmittelhyg. 17 (1965), 12.
29. Herrmann, Ch.: Gewinnung von Antiseren für den Nachweis von Fremdeiweiß in hoherhitzten Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 270.
30. Herrmann, Ch.: Eigene Mitteilung.
31. Ingraham, J. S.: Formalinization of red cells, sensitivitized by antigens.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 99 (1958), 1043.
32. Ingraham, J. S.: The Preparation and Use of Formalinized Erythrocytes with Attached Antigens or Haptens to Titrate Antibodies.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 99 (1958), 452.

33. Jaenicke, R.: Wärmeaggregation und Wärmedenaturierung von Proteinen.
Dechema-Monographien 56 (1965), 207.
34. Jeness, R. und S. Patton: Grundzüge der Milchchemie.
Bayer. Landwirtschaftsverl. München-Basel - Wien. 1959
35. Kabat, E.A.: Kabat and Mayer's experimental immunochemistry 2nd. ed. Springfield III.: Charles C Thomas Publ. 1961.
36. Keogh, E.V., E.A. North und M.F. Warburton:
Hemagglutinines of the Hemophilus group.
Nature 160 (1947), 63.
37. Kluge-Wilm, R.: Serologischer Nachweis in hocherhitzten Fleischwaren.
Vet. Med. Diss. Berlin 1967.
38. Kotter, L., Ch. Herrmann, C. Ring und J. Corsico:
Untersuchungen zur Steigerung der Antikörperbildung gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen.
Zbl. Vet. Med. Reihe B, 15 (1966), 613.
39. Kotter, L., Ch. Herrmann und J. Corsico:
Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.
Z. Lebensmittel.-Unters. Forsch. 133 (1966), 15.
40. Kotter, L. und Ch. Herrmann: Methoden zum Nachweis von Fremdeiweiß nach serologischen Verfahren.
Fleischwirtschaft, 49 (1969), 1175.

41. Kraus, R. und St. Ludwig: Über Bacteriohämagglutinine und Antihämagglutinine. Wien. Klin. Wschr. 23 (1902), 120.
42. Krüger, H. und D. Großklaus: Untersuchungen zum serologischen Nachweis von Soja-protein in erhitzten Fleischwaren. Fleischwirtsch. 50 (1970), 1529.
43. Krüger, H. und D. Großklaus: Untersuchungen zum serologischen Nachweis von Soja-protein in erhitzten Fleischwaren. 51 (1971), 181 und 315.
44. Landy, M.: On hemagglutination procedures utilizing isolated polysaccharide and proteine antigens. Amer. J. Publ. Health 44 (1954), 1059.
45. Le Minor, L., S. Le Minor und J. Grabar: Reactions d'hémagglutination passive et d'hémolyse directe au moyen de globules rouges sensibilisés par des substances solubles O et Vi. Am. Inst. Pasteur Paris 83 (1952), 62.
46. Neter, E.: Bacterial hemagglutination and hemolysis. Bact. Rev. 20 (1956), 166.
47. Neter, E., E.A. Gorynski, R.M. Gino, O. Westphal und O. Lüderitz: The entobacterial hemagglutination test and its diagnostic potentials. Can J. Microbiol. 2 (1956), 232.
48. Neter, E., O. Westphal und O. Lüderitz: Effects of Lecithin, cholesterol and antibody neutralization by enterbacterial lipopolysaccharides. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 88 (1955), 339.

49. Neumann, K.: Grundriß der Gefriertrocknung.
2. Auflage Verlag Musterschmidt,
Göttingen 1952.
50. Ouchterlony, Ö.: Diffusion in-gel-methods for
immunological analysis I.
Progr. Allergy 5 (1958), 1.
51. Ouchterlony, Ö.: Diffusion in-gel-methods for
immunological analysis II.
Progr. Allergy 6 (1962), 30.
52. Oudin, J.: La Diffusion d'un antigène dans une
colonne de gel contenant les anticorps
precipitants homologues. Etude quanti-
tative des trois principales variables.
Comptes rend. Acad. Sci. 228 (1949), 1890.
53. Pauling, I. und D. Pressman: Serological properties
of simple substances (V) pptn. of poly-
haptenic simple substances and antiserum
homologous to the p(p-azo-phenylazo)
phenylarsonic acid group and its inhi-
bition by haptens.
J. Amer. Chem. Soc. 65 (1943), 728.
54. Pauling, I. und D. Pressman: Reactions of antiserum
homologous to p-azophenyltrimethyl-
ammonium group.
J. Amer. Chem. Soc. 68 (1946), 250.
55. Scheidegger, I. I.: Une micro-méthode d'immuno-
electrophorese.
Int. Arch. Allergy 7 (1955), 103.
56. Schmidt, W. A.: Über ein Präzipitin, welches es er-
möglichst, auch gekochtes (unlösliches)
Eiweiß zu differenzieren.
Z. Immun. Forsch. 13 (1912), 166.

57. Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie. 2. Auflage
Steinkopff, Darmstadt.
(1955), 364 und 744.
58. Sieburth, I.M.: Indirect hemagglutination studies
on salmonellosis of chicken.
Z. Immun. 78 (1957), 380.
59. Sinell, H.J. und R. Kluge-Wilm: Immunelektrophore-
tischer Nachweis von aufgeschlossenem
Milcheiweiß in erhitzten Fleischerzeug-
nissen und Versuche zu einer quantita-
tiven Auswertung.
Zbl. Vet. Med. Reihe B, 15 (1968), 802.
60. Singer, I.M. und C.M. Plotz: The latex fixation
test for rheumatoid arthritis using
patients own gamma globulin.
Amer. J. Med. 21 (1956), 888.
61. Stavitzky, A.B.: Micromethods for the study of
proteins and antibodies. I. Procedure
and general application of hemaggluti-
nation and hemagglutinationsinhibitions-
reactions with tannic acid and protein
treated red blood cells.
J. Immunol. 78 (1957), 380.
62. Stavitzky, A.B. und E.R. Arquilla: Micromethods
for the study of proteins and antigens.
J. Immunol. 74 (1955), 306.
63. Uhlenhut, P. und W. Seiffert: Die biol. Eiweiß-
differenzierung mittels der Präzipitation.
In: Kolle-Kraus-Uhlenhut: Handbuch der
pathogenen Microorganismen.
G. Fischer, Jena, 3 (1930), 365.

64. Uhlenhut, P.: Unterscheidung des Fleisches verschiedener Tiere mit Hilfe spezieller Sera und die praktische Anwendung der Methode in der Fleischbeschau.
Dtsch. Med. Wschr. 27 (1901), 780.
65. Ullmann: Enzyklopädie der technischen Chemie: Polymerisate des Styrols,
14 (1963), 187.
66. Wadsworth, C. und L.A. Hanson: Comparative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique.
Int. Arch. Allergy 17 (1960), 165.
67. Warnecke, M.O. und R.L. Saffle: Serological Identification of Animal Proteins 1. Mode of Injection and Protein Extracts for antibody production.
J. Food Sci. 33 (1968), 131.
68. Wide, L. und C.A. Gemzell: Über die Formalinisierung sensibilisierter Hammelerythrozyten.
Acta endocrinica (Kbh.) 35 (1960), 261.
69. Weinbach, K.: Die Verwendbarkeit formolbehandelter Erythrozyten als Antigenträger in der indirekten Hämagglutination.
Schweiz. Z. Bact. 21 (1958), 1043.
70. Wyler, O. und I. I. Siegrist: Einfache, empfindliche Nachweismethode für fleischfremde, tierische Eiweißarten.
Hyg. 56/4 (1965), 299.

Jetzt, nach Vollendung meiner Dissertationsarbeit, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Kotter für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung, die er meiner Arbeit angedeihen ließ, herzlichst bedanken.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Fräulein Dr. Chr. Herrmann, deren Rat und Hinweise den Fortschritt meiner Arbeit beeinflussen und zu deren Gelingen beitrugen.

LEBENS LAUF

Am 2. Februar 1946 wurde ich in Homburg (Saarland) als Tochter des Apothekers Erwin Stutz und seiner Ehefrau Ida Stutz, geborene Post, geboren.

Von 1953 - 1957 besuchte ich in Ludwigshafen/Rhein die Grundschule. Das Abitur bestand ich im März 1966.

Im Mai 1966 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Ich beendete mein Studium im April 1971 mit dem Staatsexamen. Im Mai 1971 bekam ich meine Bestallung als Tierarzt.

